

BEST AVAILABLE COPY

PCT/JP 2004/009834

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

30.7.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2003年 7月11日

出 願 番 号
Application Number: 特願2003-196154
[ST. 10/C]: [JP 2003-196154]

出 願 人
Applicant(s): 萬有製薬株式会社

REC'D 24 SEP 2004

WIPO

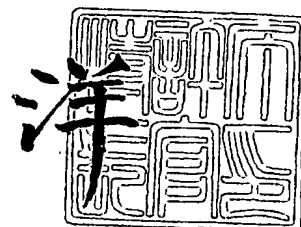
PCT

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 9月 9日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



出証番号 出証特2004-3080943

【書類名】 特許願
【整理番号】 0322
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 G01N 33/50

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市大久保3番地 萬有製薬株式会社 つくば研究所内

【氏名】 小谷 秀仁

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市大久保3番地 萬有製薬株式会社 つくば研究所内

【氏名】 板谷 啓

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市大久保3番地 萬有製薬株式会社 つくば研究所内

【氏名】 荒木 啓充

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市大久保3番地 萬有製薬株式会社 つくば研究所内

【氏名】 高橋 和彦

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市大久保3番地 萬有製薬株式会社 つくば研究所内

【氏名】 諏訪 博昭

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市大久保3番地 萬有製薬株式会社 つくば研究所内

【氏名】 小田桐 奈央

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市大久保3番地 萬有製薬株式会社 つくば研究所内

【氏名】 小林 勉

【特許出願人】

【識別番号】 000005072

【住所又は居所】 東京都中央区日本橋本町2丁目2番3号

【氏名又は名称】 萬有製薬株式会社

【代表者】 長坂 健二郎

【電話番号】 (03)3270-3222

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 013077

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 LCEによる肥満治療に有効な化合物の評価方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 被検化合物を、被検動物又は被検細胞に、投与又は接触させる工程と、

該被検化合物が、該被検動物又は該被検細胞中でLCE(Long chain fatty acyl elongase)遺伝子あるいは該遺伝子と機能的に等価な遺伝子の発現レベルを調節するか否かを確認する工程とを含むことを特徴とする肥満の治療又は予防に有効な化合物の評価方法。

【請求項 2】 被検化合物を、LCE遺伝子の発現調節領域とレポーター遺伝子との融合遺伝子を有する被検動物又は被検細胞に接触させる工程と、

該レポーター遺伝子の被検動物又は被検細胞中での発現レベルを測定する工程とを含むことを特徴とする肥満の治療又は予防に有効な化合物の評価方法。

【請求項 3】 被検化合物を、LCEタンパク質に接触させる工程と、
該被検化合物が、該タンパク質の活性に影響を与えるか否かを確認する工程とを含むことを特徴とする肥満の治療又は予防に有効な化合物の評価方法。

【請求項 4】 被検化合物を、LCEを含む複数種のエロンゲース(elongase)タンパク質に接触させる工程と、

該複数種のエロンゲースタンパク質の活性を測定する工程と、

該複数種のエロンゲースタンパク質においてLCEの活性を特異的に阻害する被検化合物を選択する工程とを含むことを特徴とする肥満の治療又は予防に有効な化合物の評価方法。

【請求項 5】 請求項 1～3 のいずれか一項に記載の評価方法によって得られた化合物を有効成分として含有する肥満の治療又は予防剤。

【請求項 6】 LCEの脂肪酸合成活性を抑制することを特徴とする脂肪酸合成抑制方法。

【請求項 7】 LCEの脂肪酸合成活性をRNAi(RNA interference)により抑制することを特徴とする脂肪酸合成抑制方法。

【請求項 8】 前記RNAiが配列番号 13～38 又は 49～54 のいずれかに

記載の塩基配列を有するRNAを使用したものであることを特徴とする請求項5に記載の脂肪合成抑制方法。

【請求項9】 LCEの脂肪酸合成活性を抑制する工程を含むことを特徴とする肥満の治療又は予防方法。

【請求項10】 LCEの脂肪酸合成活性をRNAi (RNA interference)により抑制することを特徴とする肥満の治療又は予防方法。

【請求項11】 前記RNAiが配列番号13～38又は49～54のいずれかに記載の塩基配列を有するRNAを使用したものであることを特徴とする請求項7に記載の肥満の治療又は予防方法。

【請求項12】 被検組織又は被検細胞におけるLCE遺伝子の発現レベル又は発現レベルの変化を測定することを特徴とする肥満の検査方法。

【請求項13】 被検組織又は被検細胞におけるLCEタンパク質の発現レベル又は発現レベルの変化を測定することを特徴とする肥満の検査方法。

【請求項14】 被検組織又は被検細胞におけるLCE遺伝子に存在する多型を検出することを特徴とする肥満の検査方法。

【請求項15】 LCEタンパク質と相互作用することによりLCE遺伝子の発現量に影響を及ぼすタンパク質の発現量又は活性を検出することを特徴とする肥満の検査方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、LCE遺伝子又はタンパク質を用いた肥満の治療又は予防に有効な化合物の評価方法に関する。また、本発明は、前記遺伝子又はタンパク質を用いた肥満の検査方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 肥満は、高血圧症、糖尿病、高脂血症、虚血性心疾患等に代表される種々の成人病の危険因子である。また、これらの多くは慢性疾患であることから、将来的には医療費の高騰の原因になると考えられ、社会的にも大きな問題となっている。

【0003】

このような肥満を防止するために抗肥満薬の開発が進められており、現在では、食欲抑制剤や脂質吸収阻害剤が臨床的に利用されている。ここで、抗肥満薬研究の標的分子としては、これまでにレプチン、PPAR γ 、ニューロペプチドY等が知られているが、肥満の原因は非常に多様であるため、創薬標的として作用機序の異なった標的分子が待望されている。

【0004】

また、このような肥満状態あるいはその原因を適切に診断することは、その後の適切な治療にとって不可欠であるため、簡便で精度の高い肥満マーカーの出現が望まれている。また、近年、投与した薬剤の効果が被投与者の遺伝子多型等の遺伝子型に影響を受ける現象が見出されており、薬剤の開発段階における臨床試験やいわゆるオーダーメイド医療において、分子レベルでの検査や診断のマーカーが待望されている。

【0005】

一方、脂肪酸の生合成はアセチルCoAカルボキシラーゼと脂肪酸合成酵素によって行われる。LCE (Accession No. NM_024090 (ヒト: 配列番号 1)、NM_130450 (マウス: 配列番号 2)) は、脂肪酸合成酵素の一種であり、アセチルCoAを基質として合成が始まる脂肪酸合成経路において、ラウリン酸からミリスチン酸、ミリスチン酸からパルミチン酸、パルミチン酸からステアリン酸、パルミトレイン酸からワクセン酸等、主に炭素数が12以上の脂肪酸の炭素鎖の伸長を司ることが知られている (J. Biol. Chem., 276(48), 45358-45366, (2001) (非特許文献1))。

【0006】

例えば、W002/44320号公報 (特許文献1) には、ELG5 (LCE) が多不飽和脂肪酸 (PUFA) を基質としてエロンゲース (elongase) としての活性を有することが記載されている。また、糖尿病モデルラットである STZ induced diabetic rat の肝臓においてエロンゲースの活性が亢進する旨の報告 (Suneja et al., 1990, Biochem. Biophys. Acta, 1042: 81-85 (非特許文献2)) を引用して、エロンゲースが糖尿病等の疾患に関与するとの記載がある。

【0007】

また、J. Lipid Res. (Matsuzaka T. et al., 43(6):911-20(2002) (非特許文献3))には、摂餌によりマウスFACE(LCE)の発現量が増加する旨の記載がある。

【0008】

【特許文献1】

W002/44320号

【非特許文献1】

J. Biol. Chem., 276(48), 45358-45366, (2001)

【非特許文献2】

Suneja et al., Biochem. Biophys. Acta, 1042: 81-85(1990)

【非特許文献3】

Matsuzaka T. et al., J. Lipid Res., 43(6): 911-20(2002)

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、前記文献には、LCEと肥満とについて直接的に示したデータは開示されておらず、また、その際、LCEの飽和脂肪酸に対するエロンゲース活性が重要な役割を果たすことについては何ら示されていなかった。

【0010】

本発明は、上記従来技術の有する課題に鑑みてなされたものであり、LCEと肥満との直接的な関係を示すことにより、分子レベルで判断可能な肥満又は痩せ検査方法及び当該分子を用いた肥満及び痩せの検査薬等を提供することを目的とする。また、肥満又は痩せの治療薬や診断薬をスクリーニングする等、化合物の評価方法を提供することを目的とする。さらに、脂肪合成の抑制や肥満の抑制する方法を提供することを目的とする。

【0011】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、上記目的を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、体重変化とLCEの発現量との間に一定の相関関係があることを見出し、本発明を完成した。

【0012】

すなわち、本発明の肥満の治療又は予防に有効な化合物の評価方法は、被検化

合物を、被検動物又は被検細胞に、投与又は接触させる工程と、前記被検化合物が、前記被検動物又は前記被検細胞中でLCE(Long chain fatty acyl elongase)遺伝子あるいは前記遺伝子と機能的に等価な遺伝子の発現レベルを調節するか否かを確認する工程とを含むことを特徴とする。

【0013】

また、本発明の肥満の治療又は予防に有効な化合物の評価方法は、被検化合物を、LCE遺伝子の発現調節領域とレポーター遺伝子との融合遺伝子を有する被検動物又は被検細胞に接触させる工程と、前記レポーター遺伝子の被検動物又は被検細胞中での発現レベルを測定する工程とを含むことを特徴とする。

【0014】

さらに、本発明の肥満の治療又は予防に有効な化合物の評価方法は、被検化合物を、LCEタンパク質に接触させる工程と、前記被検化合物が、前記タンパク質の活性に影響を与えるか否かを確認する工程とを含むことを特徴とする。

【0015】

また、本発明の肥満の治療又は予防に有効な化合物の評価方法は、被検化合物を、LCEを含む複数種のエロンゲース(elongase)タンパク質に接触させる工程と、前記複数種のエロンゲースタンパク質の活性を測定する工程と、前記複数種のエロンゲースタンパク質においてLCEの活性を特異的に阻害する被検化合物を選択する工程とを含むことを特徴とする。

【0016】

ここで、前述した肥満の治療又は予防に有効な化合物の評価方法によって得られた化合物を有効成分として含有する肥満の治療又は予防剤も本発明に含まれる。

【0017】

また、本発明の脂肪合成抑制方法は、LCEの脂肪酸合成活性を抑制することを特徴とする。ここで、前記脂肪酸合成活性を抑制する方法としては特に制限はないが、RNAi(RNA interference)により抑制することが好ましい。

また、肥満の治療又は予防方法は、LCEの脂肪酸合成活性を抑制する工程を含むことを特徴とする。ここで、前記脂肪酸合成活性を抑制する方法としては特に制

限はないが、RNAiにより抑制することが好ましい。

【0018】

また、本発明の肥満の検査方法は、被検組織又は被検細胞におけるLCE遺伝子の発現レベル又は発現レベルの変化を測定することを特徴とする。

【0019】

さらに、本発明の肥満の検査方法被検組織又は被検細胞におけるLCEタンパク質の発現レベル又は発現レベルの変化を測定することを特徴とする。

【0020】

また、本発明の肥満の検査方法は、被検組織又は被検細胞におけるLCE遺伝子に存在する多型を検出することを特徴とする。

【0021】

さらに、肥満の検査方法は、LCEタンパク質と相互作用することによりLCE遺伝子の発現量に影響を及ぼすタンパク質の発現量又は活性を検出することを特徴とする。

【0022】

【発明の実施の形態】

以下、本発明の好適な実施形態について詳細に説明する。

【0023】

本発明における「発現レベル」とはLCE遺伝子の転写産物の絶対量又は相対量をいう。この場合、当該遺伝子は、DNA又はmRNAのいずれをも含む。また、発現の検出対象がタンパク質の場合、その「発現レベル」とは、LCE遺伝子の翻訳産物の絶対量又は相対量をいう。

【0024】

また、本発明における「被検動物」とは、化合物の評価に使用できる動物であれば、その種は特に限定されないが、具体的には、例えば、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、イヌ、サルが挙げられる。

【0025】

また、本発明における「被検組織」とは、肥満又は痩せの検査を行う際に生体から抽出可能な組織であれば、その種類は特に限定されないが、肥満又は痩せの

影響が反映されやすいとの観点から、例えば、肝臓組織、脂肪組織、筋肉組織、血液組織であることが好ましい。また、組織の単離が容易であるとの観点から、前記組織の中でも血液組織であることが好ましい。ここで、これらの組織の由来となる動物種については特に制限されないが、本発明の主たる用途がヒトの臨床的使用であることから、ヒトであることが好ましい。

【0026】

また、本発明における「被検細胞」についても、肥満又は痩せの検査を行う際に生体から抽出可能な細胞であれば、その種類は特に限定されないが、肥満又は痩せの影響が反映されやすいとの観点から、例えば、肝細胞、脂肪細胞（白色脂肪細胞、褐色脂肪細胞等）、筋肉細胞（筋芽細胞、骨格筋細胞平滑筋細胞等）、脾細胞（脾島細胞等）、血球細胞であることが好ましい。ここで、かかる組織の由来となる動物種については特に限定されないが、本発明の主たる用途がヒトの臨床的使用であることから、ヒトであることが好ましい。

【0027】

さらに、本発明における「肥満」とは、脂肪組織が過剰に蓄積した状態と定義される一般的な肥満に加え、これに糖尿病や高血圧等の合併症又は内臓脂肪が伴う、いわゆる「肥満症」も含む。また、本発明における「肥満」は、薬物投与等による体重のコントロールを受けた場合に、もとの体重と比較して相対的に体重が増加した状態をも意味する。

【0028】

また、本発明における「検査」とは、肥満又は痩せであることを単に判断するのみならず、将来的な肥満又は痩せを「予測」する場合をも含む。

【0029】

また、本発明における「エロンゲース活性」とは、脂肪酸の炭素鎖を伸長させる活性を意味する。

【0030】

(1) 肥満の治療又は予防に有効な化合物の評価方法

被検化合物を被検動物や被検細胞に投与、接触させることにより変動するLCE遺伝子の発現量を測定したり、被検化合物をLCEタンパク質に接触させて当該タ

ンパク質の活性に及ぼす影響を検討することにより、当該被検化合物の評価を行うことが可能となる。

【0031】

すなわち、このような被検化合物の中には、細胞や組織に作用することにより、LCE遺伝子の発現レベルやLCEタンパク質の活性を正常化あるいはコントロールし、脂肪の蓄積や食欲のコントロール等、肥満の原因となるメカニズムの正常化を図ることができるものがあると考えられる。従って、以下に説明するような評価方法により、肥満の治療薬又は予防に有効な化合物を評価することが可能となる。

【0032】

(A) LCE遺伝子の発現レベル調節能を指標とする評価方法

被検化合物を被検動物又は被検細胞に投与又は接触させ、当該被検化合物が被検動物又は被検細胞中でLCE遺伝子あるいは当該遺伝子と機能的に等価な遺伝子の発現レベルを調節するか否かを確認することにより、肥満の治療又は予防に有効な化合物を評価することが可能となる。

【0033】

具体的には、以下の手順で被検化合物の評価を行う。

【0034】

先ず、被検化合物を被検動物又は被検細胞に投与又は接触させる。ここで、被検化合物としては、肥満の治療又は予防薬の候補化合物であれば、その構造や性質は問わず、化合物種も限定されない。

【0035】

被検化合物を被検動物に投与する方法としては特に制限はなく、具体的には、例えば、経口投与、非経口投与（例えば、経皮投与、筋肉内注射、静脈内注射、皮下注射）が挙げられる。また、被検化合物を被検細胞に接触させる方法としても特に制限はなく、具体的には、例えば、培養液や緩衝液（リン酸緩衝液等）等の溶液中で混合し両者を接触させる方法が挙げられる。

【0036】

次に、被検化合物が被検動物又は被検細胞中でLCE遺伝子あるいは当該遺伝子

と機能的に等価な遺伝子の発現レベルを調節するか否かを確認する。

【0037】

前記遺伝子の発現レベルの調節の有無の確認法としては、特に制限はなく、前述の投与又は接触の前を対照とし、当該遺伝子の発現量の変化をRT-PCRのような遺伝子増幅法、DNAマイクロアレイを用いる方法又はノーザンハイブリダイゼーション法等によって検出することにより実施することができる。また、前記遺伝子の発現調節領域とレポーター遺伝子との融合遺伝子を人為的に導入した動物又は細胞を用いてもよい。この場合、レポーター遺伝子としては、具体的には、例えば、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子又はグリーンフルオレッセンスプロテイン遺伝子が挙げられる。

【0038】

ここで、「LCE遺伝子と機能的に等価な遺伝子」とは、LCE遺伝子と塩基配列は異なるものの、比較的高い相同性を示し、LCEと同じ又は類似の活性を有する遺伝子を示す。ここで、前記相同性は、遺伝子の機能が等価であれば特に制限はないが、塩基配列の相同性が70～100%であることが好ましく、80～100%であることがより好ましく、90～100%であることがさらに好ましく、95～100%であることが特に好ましい。相同性が前記下限より低い場合には、LCEと同じ又は類似の機能を示さない可能性が高い傾向にある。しかしながら、塩基配列の相同性が前記下限未満であっても、LCEに特有の機能を有するドメインと、当該ドメインに対応する塩基配列との相同性が高い場合にはLCE遺伝子と同様又は類似の機能を有する場合がある。このような遺伝子は、塩基配列の相同性が前記範囲外であっても好適に使用可能である。また、比較的高い相同性の遺伝子としては、LCE遺伝子における1又は2以上の塩基が自然若しくは人工的に置換、欠失、不可及び／又は挿入したものであってもよい。

【0039】

(B) LCEタンパク質の活性を指標とする評価方法

被検化合物をLCEタンパク質に接触させ、被検化合物が当該タンパク質の活性に影響を与えるか否かを確認することにより、肥満の治療又は予防に有効な化合物を評価することが可能となる。

【0040】

具体的には、以下の手順で被検化合物の評価を行う。

【0041】

先ず、被検化合物をLCEタンパク質に接触させる。

【0042】

このようなタンパク質と被検化合物を接触させる方法としては、特に制限はなく、具体的には、例えば、緩衝液（リン酸緩衝液等）等の溶液中で混合し接触させる方法が挙げられる。

【0043】

次に、被検化合物が当該タンパク質の活性に影響を与えるか否かを確認する。タンパク質の活性測定における条件は、使用するタンパク質の性質により適宜設定すればよい。このような条件としては、具体的には、例えば、LCEタンパク質の場合には、エロンゲース活性を指標とすることができ、具体的には、例えば、細胞から抽出したミクロソーム画分を、NADPH、パルミトイルCoA、 ^{14}C 標識マロニルCoA等を含む溶液中で混合してインキュベートし、脂肪酸を抽出した後、脂肪酸に含まれる放射性比活性を測定することによりエロンゲース活性を測定することができる。また、J. Biol. Chem., 276(48), 45358-45366, (2001)を参照して行うこともできる。

【0044】

以上説明したような本発明の肥満の治療又は予防に有効な化合物の評価方法により、肥満の治療薬や診断薬のスクリーニングや、これらの薬剤の有効性又は安全性の評価、さらには、オーダーメイド治療における適切な薬剤の選択が可能となる。

【0045】

(C) LCEタンパク質を特異的に阻害する化合物の評価方法

被検化合物を、LCEを含む複数種のエロンゲースタンパク質に接触させ、当該複数種のエロンゲースタンパク質の活性を測定した後、LCEの活性を阻害する被検化合物を選択することにより、エロンゲースの中でもLCE特異的にエロンゲース活性を阻害する化合物を評価・選択することが可能となる。

【0046】

具体的には、以下の手順で評価を行う。

【0047】

先ず、被検化合物を、LCEを含む複数種のエロンゲースタンパク質にそれぞれ接触させる。このようなタンパク質と被検化合物を接触させる方法としては、特に制限はなく、具体的には、例えば、緩衝液（リン酸緩衝液等）等の溶液中で混合し接触させる方法が挙げられる。ここで、複数種のエロンゲースとは、エロンゲース活性を有するものであればその種類は特に制限されないが、具体的には、例えば、FAS、ELO-1が挙げられる。

【0048】

次に、被検化合物がそれぞれのタンパク質の活性に影響を与えるか否かを確認する。タンパク質の活性測定における条件は、使用するタンパク質の性質により適宜設定すればよい。このような条件としては、例えば、LCEタンパク質の場合には、エロンゲース活性を指標とすることができ、具体的には、J. Biol. Chem., 276(48), 45358-45366, (2001) を参照して行うことができる。また、他のエロンゲースにおいては、LCEと同様にエロンゲース活性を指標にすればよく、公知の方法に従って活性測定を行えばよいが、例えば、前記のJ. Biol. Chem., 276(48), 45358-45366, (2001) を参照して実施することができる。

【0049】

以上説明したような本発明の肥満の治療又は予防に有効な化合物の評価方法により、肥満の治療薬又は診断薬のスクリーニングや、これらの薬剤の有効性又は安全性の評価、さらには、オーダーメイド治療における適切な薬剤の選択が可能となる。

【0050】

(2) 脂肪合成抑制方法及び肥満の治療又は予防方法

LCEは脂肪の構成成分である脂肪酸の合成酵素であることから、かかる酵素活性を阻害することにより脂肪酸の合成を阻害することが可能となり、ひいては、脂肪の合成を阻害することが可能となる。

【0051】

具体的には、以下の手順で行う。

【0052】

まず、LCEの活性を阻害する物質を選択する。かかる物質としては、例えば、LCE阻害剤として機能する化合物、LCEの抗体、アンチセンスヌクレオチド又はRNAiに使用するセンスRNA・アンチセンスRNAが挙げられる。

次に、LCEが存在する個体、組織、細胞に対して前記の物質を導入する。

具体的には、対象が個体であれば、導入方法としては特に制限はないが、前記化合物等を、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射等の他、鼻腔内の、経気管支的、筋肉的又は経口的に導入する方法が挙げられる。

また、対象が組織であれば、導入方法としては特に制限はないが、組織中への注入、緩衝液中での混合により導入する方法が挙げられる。

さらに、対象が細胞であれば、導入方法としては特に制限はないが、緩衝液中での混合、エレクトロポレーション等が挙げられる。より具体的には、RNAiであれば、例えば、リポソームに封入したRNAiを細胞培養液に添加し細胞に接触させることで細胞内にRNAiを導入することができる (Nature, 411, 494-498, (2001)、J.Cell Sci., 114(Pt 24), 4557-4565, (2001)、Biochem.Biophys.Res.Comm., 301(3), 804-809, 2003)。

【0053】

このようにLCEの活性を阻害することにより、脂肪酸の炭素鎖の伸張反応が抑制され、脂肪酸の生合成が抑制される。

【0054】

また、かかる脂肪合成抑制方法を肥満の治療又は予防に応用することができる。

すなわち、生体内でLCEの活性を阻害することにより脂肪酸の合成を抑制し、結果的に脂質の合成を抑制することにより肥満の治療又は予防が可能となる。

具体的には、以下の手順で行う。

まず、LCEの活性を阻害する物質を選択する。かかる物質としては、例えば、LCE阻害剤として機能する化合物、LCEの抗体、アンチセンスヌクレオチド又はRNAiに使用するセンスRNA・アンチセンスRNAが挙げられる。

次に、このような物質を生体内に投与する。投与方法としては、特に制限はないが、例えば、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射等の他、鼻腔内的、経気管支的、筋肉の又は経口的な投与方法が挙げられる、

(3) 肥満又は痩せの検査方法

(A) LCE遺伝子の発現レベルを測定することによる肥満または痩せの検査方法

被検組織又は被検細胞におけるLCE遺伝子の発現レベルの変化を検出することにより、又は、発現レベルを測定することにより、当該被検組織又は被検細胞を抽出した生体（例えばヒト）が肥満であるか否かを検査・診断することが可能である。また、単に検査時の肥満の状態を検査するのみならず、将来的に肥満又は痩せになりうるかを予測することも可能である。

【0055】

以下に、このような検査の具体的な方法について説明する。

【0056】

先ず、検査対象となる生体より被検組織又は被検細胞を抽出する。このような抽出の方法としては特に制限はなく、公知の方法により抽出することができる。

【0057】

次に、抽出された被検組織又は被検細胞から発現レベルの測定の対象となる遺伝子を調製する。LCE遺伝子の発現レベルを測定するには、先ず、被検組織又は被検細胞からLCEのRNA（total RNA又はmRNA）を調製する必要がある。このようなRNAの調製は、公知の方法によって行うことができるが、例えば、Molecular cloning A LABORATORY MANUAL 2nd EDITION (1989) (T. Maniatis著: Cold Spring Harbor Laboratory Press) 7.3-7.36を参照して行うことができる。こうして調製したRNAを用いて、例えば、RT-PCRのような遺伝子増幅法、DNAマイクロアレイ（例えば、Affymetrix社製DNAチップ）を用いる方法、ノーザンハイブリダイゼーション法により、その発現量を測定することができる。また、被検組織又は被検細胞を用いたインサイチュハイブリダイゼーション（in situ hybridization）等により、その発現量を測定することもできる。

【0058】

また、LCE遺伝子の発現レベルの変化を検出するには、前記の発現量の測定を当該発現量が増加すると予測される期間の前後（例えば、肥満治療薬の投与の前後）について行い、発現量の差を測定すればよい。

【0059】

具体的には、被検組織又は被検細胞において、前述したLCE遺伝子の発現量が増加すると予測される期間の前後で、その発現レベルが有意に上昇した場合に、体重の増加があった又は将来的に増加する可能性があることを診断できる。

【0060】

(B) LCEタンパク質の発現レベルを測定することによる肥満又は痩せの検査方法

被検組織又は被検細胞におけるLCEタンパク質の発現レベルの変化を検出することにより、又は、発現レベルを測定することにより、当該被検組織又は被検細胞を抽出した生体（例えばヒト）が肥満であるか否かを検査・診断することが可能である。また、単に検査時の肥満状態を検査するのみならず、将来的に肥満又は痩せになりうるかを予測することも可能である。

【0061】

以下、このような検査の具体的な方法について説明する。

【0062】

タンパク質の発現レベルを測定する方法としては、生体から単離したタンパク質を定量する方法やタンパク質の血中濃度を測定する方法があり、具体的な方法としては特に限定されない。

【0063】

生体から単離したタンパク質を定量する方法の具体例としては、以下のとおりである。まず、被検組織又は被検細胞からLCEタンパク質を調製する。このようなタンパク質の調製は、公知の方法によって行うことができる。こうして調製したタンパク質から、例えば、プロテインチップ（例えば、CIPHERGEN社製プロテインチップシステム）を用いる方法、免疫学的方法（例えば、ELISA、EIA法、ウエスタンブロッティング法）により、その発現量を測定することができる。また、被検組織又は被検細胞を用いた免疫染色等によって、その発現量を測定するこ

ともできる。一方、タンパク質の血中濃度を測定する方法の具体例としては、生体から採取した血液を用いて、上記免疫学的方法等により、LCEタンパク質を定量する方法が挙げられる。

【0064】

以上のようにして、LCEの遺伝子又はタンパク質の発現レベルを測定した後、その結果を解析することにより、被検体の肥満を検査できる。すなわち、本発明より、LCEタンパク質の発現レベルと体重は一定の相関関係を有することが明らかにしたため、上記検査結果と対照群（健常人等）におけるLCEタンパク質の発現量とを比較することにより、肥満の程度を判断することが可能となる。また、本発明の検査方法によれば、単に検査時の肥満の状態を検査するのみならず、将来的な肥満又は痩せの可能性の予測も可能となる。

【0065】

また、LCEタンパク質の発現レベルの変化を検出するには、前記の発現量の測定を当該発現量が変化すると予測される期間の前後（例えば、肥満治療薬の投与の前後）について行い、発現量の差を測定すればよい。

【0066】

具体的には、被検組織又は被検細胞において、前述したLCEタンパク質の発現量が増加すると予測される期間の前後でその発現レベルが有意に上昇した場合に、体重の増加があった又は将来的に増加する可能性があるとして診断できる。

【0067】

(C) LCE遺伝子の遺伝的多型を検出する肥満又は痩せの検査方法

LCE遺伝子に遺伝的多型が存在する場合、その多型の有無や種類によりLCE遺伝子又はタンパク質の発現レベルが変化したり、当該タンパク質の活性に異常が生じる場合がある。従って、このような遺伝的多型を検出することによりLCEの発現や活性に関する知見を得、さらに、被検組織や被検細胞の由来となった被検体の肥満の検査を行うことができる。このような遺伝的多型としては、具体的には、例えば、ミニサテライト、マイクロサテライト、SNP(single nucleotide polymorphism: 一塩基多型)が挙げられる。

【0068】

LCE遺伝子における多型の検出は以下のようにして行うことができる。すなわち、LCE遺伝子において、その発現量を制御する領域を検査対象となる肥満の被検体を対象として塩基配列を決定し、多型部位を検出する。検出された多型部位の対立遺伝子頻度を算出し、被検体集団において有意に増加又は減少している対立遺伝子を見出すことにより肥満と相関する多型を同定する。このようにして検出された遺伝的多型は、例えば、被検体由来のゲノムDNAについて、多型部位の塩基配列の解析、多型部位に存在する塩基の種類に依存して変化するDNAの物理化学的性質の差や制限酵素部位の相違を利用する方法、当該多型部位の検出に適切な検出用プローブを利用する方法及び質量分析法を利用した方法等によって臨床的に検出可能である。

【0069】

(D) LCEタンパク質と相互作用することによりLCE遺伝子の発現量に影響を及ぼすタンパク質の発現量又は活性を検出することによる肥満の検査方法

生体内において、多くのタンパク質は他のタンパク質と相互作用することにより、所定の生理機能を発揮する。LCEについても同様に、例えば、その発現を制御する転写因子等の作用を受けることにより発現量が制御され、所定の機能を発揮している。LCEタンパク質と、当該LCEタンパク質と相互作用することによりLCE遺伝子の発現量に影響を及ぼすタンパク質の発現量やその活性とは、一定の相関関係を有し、いずれか一方の挙動を検出することにより、他方の挙動を推測できる関係にある。

【0070】

ここで、「相互作用」とは、LCEタンパク質と別のタンパク質が直接的又は間接的に作用することをいい、例えば、LCEタンパク質が別のタンパク質と物理的に接触することによりアミノ酸の修飾等を生じるような作用や、第3のタンパク質を介して相互作用し、間接的にLCEタンパク質の発現に影響を及ぼすような作用が挙げられる。このようなタンパク質としては、例えば、LCEタンパク質を介するシグナル伝達において、LCEタンパク質の上流又は下流で生理的機能を発揮するタンパク質が挙げられる。このようなタンパク質の発現量又は活性を検出する方法としては、対象となるタンパク質の種類に応じて好適な手段を適宜選択す

ればよく、具体的な手段としては特に限定されない。

【0071】

以上の(A)～(D)で説明したような本発明の肥満の検査方法によって、分子レベルで肥満の診断が可能となるばかりか、将来的に肥満になる可能性についても予測できることとなり、従来の診断方法と比較して、よりの確な診断が可能となる。

【0072】

(4) 肥満の治療、予防剤

LCE遺伝子は、その発現量と体重とが相関関係を示す。従って、当該遺伝子の発現レベルを正常レベルへと調節する化合物は肥満の治療又は予防に有用であるのみならず、例えば、痩せ、糖尿病、高血圧症、高脂血症、虚血性心疾患にも応用可能である。このような化合物としては、上述したような本発明の化合物の評価方法によって選択された化合物が挙げられる。これらの化合物を薬剤として使用するには、当該化合物を直接患者へ投与する以外に、公知の製剤学的方法により製剤化した医薬組成物として投与することもできる。製剤化するに際し、薬理学上許容される担体若しくは媒体としては、具体的には、例えば、滅菌水、生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定化剤、結合剤、滑沢剤、甘味料、香料又は着色剤が挙げられる。また、このような医薬組成物を患者に投与する方法としては、例えば、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射等の他、鼻腔内の、経気管支的、筋肉的又は経口的な投与が挙げられる。医薬組成物の投与量は、患者の体重、年齢又は投与方法等により変動するが、当業者であれば適当な投与量を適宜選択することが可能である。

【0073】

(5) 肥満の検査薬、検査キット

LCEタンパク質の発現量は、肥満に基づく体重変化と相関関係を有する。従って、当該タンパク質に対する抗体を使用して被検細胞や被検組織中のタンパク質量を検出、測定することにより、肥満の検査を簡便に行うことができる。ここで、「抗体」とは、抗原であるLCE遺伝子産物に結合しうる抗体分子全体又はその断片をいう。このような抗体は、公知の方法によって製造することができ、モノ

クローナル抗体又はポリクローナル抗体のいずれであってもよい。また、当該抗体を用いた免疫学的測定法としては、公知の方法を使用すればよく、具体的には、例えば、蛍光抗体法、酵素抗体法が挙げられる。

【0074】

また、このような抗体を含んだキットを製造し、本発明を実施することも可能である。キットの構成としては、当該抗体に加え、例えば、抗体を検出するために蛍光標識やラジオアイソトープで標識された2次抗体や抗原抗体反応を行う際に使用する緩衝液を備えていてもよい。

【0075】

このような肥満の検査薬を使用することにより、分子レベルで肥満の診断が可能となるばかりか、将来的に肥満になる可能性についても予測できることとなり、従来の診断方法と比較して、よりの確な診断が可能となる。また、本発明の肥満の検査キットを使用することにより、前述したような的確な診断を非常に簡便に実施することが可能となる。

【0076】

【実施例】

(肥満モデル動物の作製)

製造例 1

(ニューロペプチド Y (Neuropeptide Y: NPY) Y5 アゴニスト i.c.v. 投与マウス)

NPY Y5アゴニストを投与することにより肥満を呈するモデルマウスを以下の要領で作製した。

【0077】

9～12週齢の雄マウス (C57BL/6J: クレア社製) は、室温 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 15\%$ の条件下、1プラスチックゲージに1匹ずつ飼育した。また、飼育時の明暗のサイクルは12時間とし、午前7時に点灯し、午後7時に消灯した。また、マウスには、飼料 (CE-2 (タンパク質: 25.4重量%、炭水化物: 50.3重量%、脂質: 4.4重量%): クレア社製) と水を自由に摂取させた。

【0078】

マウスは、80mg/kgペントバルビタールナトリウム（ダイナボット社製）で麻酔をかけ、滅菌された28ゲージの脳注入カニューレ（アルゼ（Alzet）社製）を右側脳質へ定位的に移植した。カニューレはブレグマより後方へ0.4mm、側方へ0.8mm、深さ2mmの位置に、頭蓋骨に対し垂直に固定した。カニューレは歯科用セメントで頭蓋骨に固定した。カニューレは、0.05%ウシ血清アルブミン（BSA）を含む10mMのリン酸緩衝液で満たした浸透圧ポンプ（モデルナンバー2002：アルゼ社製）にポリビニルクロライドチューブで接続した。10mM PBS(0.05% BSA含む)にD-Try³⁴NPY(5マイクログラム/日になるように調製)を溶解した溶液をポンプに満たした後、マウスの背中の皮下に埋め込み、抗生物質（50mg/kgのセファメジン（Cefamedine）：藤沢薬品製）を皮下注射した。

【0079】

これらのマウスを、平均体重を一致させた3つのグループ（溶媒のみを注入したグループ（vehicle group）、D-Try³⁴NPY(NPY Y5アゴニスト)を注入したグループ（ad lib fed group）、D-Try³⁴NPYを注入しペアフィードとしたグループ（pair-fed group））に分けた。

【0080】

製造例 2

（MCH投与マウス）

MCH(melanin-concentrating hormone)を投与することにより肥満を呈するモデルマウスを以下の要領で作製した。

【0081】

13週齢の雄マウス（C57BL/6J：クレア社製）は、室温23±2℃、湿度55±15%の条件下、1プラスチックゲージに1匹ずつ飼育した。また、飼育時の明暗のサイクルは12時間とし、午前7時に点灯し、午後7時に消灯した。また、マウスには、飼料（CE-2（タンパク質：25.4重量%、炭水化物：50.3重量%、脂質：4.4重量%）：クレア社製）と水は自由に摂取させた。マウスが環境に適応した頃、飼料としてMHF（タンパク質：15.0重量%、炭水化物：52.4重量%、脂質：32.6重量%、オリエンタルバイオサービス社製）を与えた。

【0082】

マウスは、80mg/kgペントバルビタールナトリウム（ダイナボット社製）で麻酔をかけ、滅菌された28ゲージの脳注入カニューレ（アルゼ（Alzet）社製）を右側脳質へ定位的に移植した。カニューレはブレグマより後方へ0.4mm、側方へ0.8mm、深さ2mmの位置に、頭蓋骨に対し垂直に固定した。カニューレは歯科用セメントで頭蓋骨に固定した。カニューレは、30%プロピレングリコールで満たした浸透圧ポンプ（モデルナンバー2002：アルゼ社製）にポリビニルクロライドチューブで接続した。ポンプはマウスの背中の皮下に埋め込み、抗生物質を皮下注射した。

【0083】

これらのマウスを、平均体重を一致させた3つのグループ（溶媒のみを注入したグループ（vehicle group）、MCHを注入したグループ（ad lib fed group）、MCHを注入しペアフィードとしたグループ（pair-fed group））に分けた。続いて、エーテル麻酔下で、ポンプをMCH(3マイクログラム/日)又は溶媒（30%プロピレングリコール）に置き換えた。

【0084】

製造例 3

(DIO(Diet induced obesity)マウス)

18週齢のマウス（C57BL/6J：クレア社製）は、室温 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 15\%$ の条件下、1プラスチックゲージに1匹ずつ飼育した。このマウスに高カロリー食であるMHF（タンパク質：18.2重量%、炭水化物：55.6重量%、脂質：15.5重量%）を6ヶ月間に渡って与え、肥満を呈するモデルマウス（DIOマウス）を作製した。なお、実施例中、「established MFD」は、これ以上体重が増えないようになるまでMHFを与えて飼育したマウスを指す。

【0085】

また、前記のマウスにMHFよりさらに高い脂肪を含有する高カロリー食であるHFD（タンパク質：20.8重量%、炭水化物：38.59重量%、脂質：32.88重量%）を与えたDIOマウス（HFD）も作製した。

【0086】

製造例 4

(食事制限をしたマウス)

マウス (C57BL/6N、17週齢) は1ケージに1匹ずつ個別に飼育した。また、エサは普通食(CA-1、CLEA)を与えた。

【0087】

摂食制限は、以下のようなスケジュールで行った。すなわち、エサ(CA-1)を1日につき3時間(10:00~13:00)だけ与え、水は自由に摂取できるようにした。摂食時間の前後で餌の重量を測定し、その差を摂食量とした。また、摂食制限をしている期間は、体重、外見の観察等をモニターした。なお、条件付けに失敗したと思われるマウス(短期間に極度な体重減少(例えば20%程度の減少)が見られるマウス)は実験には使用しなかった。かかる条件下でマウスを7日間飼育した後、白色脂肪細胞を摘出した。

【0088】

実施例 1~5 及び比較例 1

(白色脂肪細胞におけるLCEの発現)

製造例 1~4 において製造したモデルマウスを用いて、その白色脂肪細胞(WAT)及び肝臓中のLCE遺伝子の発現量を測定した。発現量の測定は、各モデルマウスの白色脂肪細胞から抽出したRNAを、mouse U74Aチップ(Affymetrix社製)を用いて処理することにより行った。

【0089】

非処理のC57BL/6Nの肝臓又はWATそれぞれにおけるLCEの発現量を1.00とした場合の、DIOマウス(DIO)、D-Try³⁴NPY投与マウス(NPY(FF))、D-Try³⁴NPY pair feeding投与群マウス(NPY(PF))、MCH投与マウス(MCH(FF))、MCH pair feeding投与群マウス(MCH(PF))、食事制限をしたマウス(Fasting)及びNPY Y5 antagonist投与マウス(Y5ant)におけるLCE遺伝子の発現量を表1に示す。

表1より明らかなように、肥満モデルマウスではLCE遺伝子の発現量が増加する傾向にあり、食事制限をしたマウスでは、その発現量が低下していた。従って、LCEの発現量と体重とが相関関係を有していることが明らかとなった。

(表1)

	肥満モデル	肝臓における LCE の発現	WAT における LCE の発現
	非処理	1.00	1.00
実施例 1	DIO マウス	4.56	1.00
実施例 2	NPY(PF)	2.11	2.47
実施例 3	NPY(FF)	2.93	6.78
実施例 4	MCH(PF)	1.00	5.57
実施例 5	MCH(FF)	1.50	2.56
比較例 1	Fasting	0.14	0.19

【0090】

実施例 6

(培養細胞におけるLCE mRNAの発現量測定)

1. LCE発現亢進細胞の作製

マウス肝臓より抽出したRNAを用いて、RT-PCR法によりマウスLCEのcDNAを増幅した。得られたPCR産物を発現ベクターpCDNA3.1にサブクローニングした後、その塩基配列を確認した。次に、マウスLCEがサブクローニングされた発現ベクターを制限酵素ScaIで直線化し、HEK293細胞に導入した。この細胞を1mg/ml G418を含む選択培地で培養することにより、マウスLCE遺伝子の安定高発現細胞株を得た。

【0091】

以下に、RT-PCRに用いたプライマーの塩基配列を示す。

mLCE-exF:5'- GCC ACC ATG GGC AAC ATG TCA GTG TTG ACT TTA C -3' (配列番号 3)

mLCE-exR:5'- CTA CTC AGC CTT CGT GGC TTT CTT -3' (配列番号 4)

2. 培養細胞におけるLCE mRNAの発現量測定

HEK293細胞からtotal RNAを精製し、逆転写反応によりcDNAを得た。ABI PRISM 7700 Sequence Detector SystemによるTaqManPCR法を用いてマウスLCE mRNA及

びヒトLCE mRNAの発現量を測定した。

マウスLCEの標準曲線は、前記のマウスLCEがサブクローニングされた発現ベクターを制限酵素ScaIにより直鎖化したDNAを用いた発現解析により作成した。また、ヒトLCEの標準曲線は、PCRにより調製したヒトLCEのcDNA断片をpcDNA3.1にサブクローニングし、ScaIにより直鎖化したDNA断片を用いた発現解析により作成した。

次に、マウスLCEの発現量をヒトLCEの発現量にて除し、導入されたマウスLCE遺伝子の発現量と内在性ヒトLCE遺伝子の発現量の比を求めた。以下に使用したプライマー及びプローブの塩基配列を記す。

マウスLCE用TaqMan probe

mLCE-P:5'-CTT TCC TGT TTT CTG CGC TGT ACG CTG -3' (配列番号5)

マウスLCE用TaqMan primer

mLCE-F:5'-GGA TGC AGG AAA ACT GGA AGA A -3' (配列番号6)

mLCE-R:5'-TGC CGA CCA CCA AAG ATA AAG -3' (配列番号7)

ヒトLCE用TaqMan probe

hLCE-P2:5'-ATC ACT GTG CTC CTG TAC T -3' (配列番号8)

ヒトLCE用TaqMan primer

hLCE-F2:5'-AGC TGA TCT TCC TGC ACT GGT AT -3' (配列番号9)

hLCE-R2:5'-GGC AAC CAT GTC TTT GTA GGA GTA -3' (配列番号10)

ヒトLCE用PCR primer

mLCE-exF:5'-GCC ACC ATG GGC AAC ATG TCA GTG TTG ACT TTA C -3' (配列番号11)

hLCE-exR:5'-CTA TTC AGC TTT CGT TGT TTT CCT C -3' (配列番号12)。

【0092】

3. 培養細胞におけるLCE活性の測定

HEK293細胞を超音波破碎した後に、超遠心操作によりミクロソーム画分を調製した。得られたミクロソーム画分を用いて以下の方法によりLCE活性を測定した。反応に必要とされるNADPH、パルミトイルCoA、¹⁴C標識マロニルCoAを含むリン酸緩衝液中にミクロソーム画分を加えて、37℃で5分間インキュベートした。次に

、15%水酸化カリウム-メタノール溶液を加え、75℃45分間加熱によるけん化処理を行なった。これに5N塩酸を加えた後、ヘキサンを用いて脂肪酸を抽出した。得られた脂肪酸に含まれる放射性比活性を測定し、脂肪酸延伸反応により脂肪酸に取り込まれたマロニルCoAの量を求めた。

【0093】

図1(a),(b)に示すように、LCEの発現が亢進した細胞株を取得できたことが確認されるとともに、これらの細胞株ではLCEの活性も亢進していることが確認できた。

【0094】

実施例7

(培養細胞中に含まれる脂肪酸組成の測定)

HEK293細胞をリン酸緩衝液中にて超音波破碎し、内部標準物質としてC17:0の中性脂肪(triglycerides)、コレステリルエステル(cholesteryl esters)及びリン脂質(phospholipids)を加えた後にクロロホルム-メタノール(2:1)により脂質成分を抽出した。得られた脂質を窒素気流下にて乾固した後、silica gel Gを用いた薄層クロマトグラフによる分画(ヘキサン:ジエチルエーテル:酢酸=80:20:1)を行い、中性脂肪、コレステリルエステル、リン脂質を分離した。これら3画分それぞれを5%塩酸-メタノールにより脂肪酸残基をメチル化し、ガスクロマトグラフ(GC-FID)を用いて脂肪酸組成の分析を行なった。

炭素鎖長18以上の脂肪酸と16以下の脂肪酸を比較した結果を図2(a)~(i)に示す。ここで、図2中、円グラフの黒塗り部分は炭素鎖の炭素数が16以下の脂肪酸を示し、白抜き部分は炭素鎖の炭素数が18以上の脂肪酸を示す。また、wtはHEK293細胞を用いた場合を示し、a5はLCEが中程度に発現した細胞株を用いた場合を示し、d8はLCEが高発現した細胞株を用いた場合を示す。

図2(a)~(i)から明らかなように、LCEの発現が亢進した細胞株では脂肪酸の炭素鎖がC18以上の構成比率が増加する傾向にあり、炭素鎖の伸長反応はLCEの活性の増強に比例して進行することが確認できた。また、細胞内では、脂肪酸のほとんどがトリグリセリド、コレステリルエステル、フォスホリピッドといったエステル体として存在する。これら全てのエステル体においてLCEの発現亢進によりC

18以上の脂肪酸の構成比率が増加する傾向が認められることから、LCEの活性変化は細胞全体の脂肪酸構成比率を変更すると考えられ、LCEは細胞の脂肪酸組成を決定する重要因子であると、本発明者らは考えている。

また、各脂肪酸の組成を比較した結果を図3(a)～(c)に示す。図3(a)～(c)から明らかなように、LCEの発現が亢進した細胞株では脂肪酸の炭素鎖がC18以上の構成比率が増加する傾向にあることが確認できた。

【0095】

実施例 8

(RNAiによるLCEの発現抑制)

1. 発現抑制実験に使用するRNAiの検討

ヒトLCE cDNA塩基配列情報に基づいて下記配列のRNAiを合成した。合成したRNAiそれぞれをHepG2細胞に導入し、24時間後に細胞からtotal RNAを調製した。次に、逆転写反応によりcDNAを作製し、ABI PRISM 7700 Sequence Detector SystemによるTaqManPCR法によりヒトLCE mRNAの発現量を測定した。

hLCE-siRNA-1 (図4(a)中、1のRNAiの配列)

5'-GACCGCAAGGCAUUCUUUUU -3' (配列番号13)

3'-UUCUGGCGUCCGUAAGUAAA -5' (配列番号14)

hLCE-siRNA-2 (図4(a)中、2のRNAiの配列)

5'-CACUCGAAUUAAGCGUUUU-3' (配列番号15)

3'-UUGUGAGCUUUAGUUCGCGAA-5' (配列番号16)

hLCE-siRNA-3 (図4(a)中、3のRNAiの配列)

5'-CACGUAGCGACUCCGAAGAUU-3' (配列番号17)

3'-UUGUGCAUCGCUGAGGCUUCU-5' (配列番号18)

hLCE-siRNA-4 (図4(a)中、4のRNAiの配列)

5'-UGAAGCCAUCCAAUGGAUGUU-3' (配列番号19)

3'-UUACUUCGGUAGGUUACCUAC-5' (配列番号20)

hLCE-siRNA-5 (図4(a)中、5のRNAiの配列)

5'-GCCAUUAGUGCUCUGGUCUUU-3' (配列番号21)

3'-UUCGGUAAUCACGAGACCAGA-5' (配列番号22)

hLCE-siRNA-6 (図 4 (a) 中、6 の RNAi の配列)
5'-AGGCCUGAAGCAGUCAGUUUU-3' (配列番号 2 3)
3'-UUUCCGGACUUCGUCAGUCAA-5' (配列番号 2 4)
LCE-siRNA-2 (図 4 (a) 中、7 の RNAi の配列)
5'-UGGACCUGUCAGCAAAUUCUU-3' (配列番号 2 5)
3'-UUACCUGGACAGUCGUUAAG-5' (配列番号 2 6)
hLCE-siRNA-7 (図 4 (a) 中、8 の RNAi の配列)
5'-AGCACCCGAACUAGGAGAUUU-3' (配列番号 2 7)
3'-UUUCGUGGGCUUGAUCCUCUA-5' (配列番号 2 8)
hLCE-siRNA-8 (図 4 (a) 中、9 の RNAi の配列)
5'-CAUCUUCUGGUCCUCACUCUU-3' (配列番号 2 9)
3'-UUGUAGAAGACCAGGAGUGAG-5' (配列番号 3 0)
hLCE-siRNA-9 (図 4 (a) 中、1 0 の RNAi の配列)
5'-UCACACGUGGUGCAGCUAAUU-3' (配列番号 3 1)
3'-UUAGUGUGCACCACGUCGAUU-5' (配列番号 3 2)
hLCE-siRNA-10 (図 4 (a) 中、1 1 の RNAi の配列)
5'-GCACUGCUGCUGGAAGACCUU-3' (配列番号 3 3)
3'-UUCGUGACGACGACCUUCUGG-5' (配列番号 3 4)
hLCE-siRNA-11 (図 4 (a) 中、1 2 の RNAi の配列)
5'-ACUGUGCGAGCACAACACAUU-3' (配列番号 3 5)
3'-UUUGACACGCUCGUGUUGUGU-5' (配列番号 3 6)
hLCE-siRNA-12 (図 4 (a) 中、1 3 の RNAi の配列)
5'-AGGGGGUGAAUACUCCCCUU-3' (配列番号 3 7)
3'-UUUCCCCACUUAUGAAGGGG-5' (配列番号 3 8)。

【 0 0 9 6 】

図 4 (a) に、各 RNAi の配列が LCE 遺伝子のどこに対応するか示した。

【 0 0 9 7 】

図 4 (b) に示すように、RNAi (hLCE-siRNA-6) を用いた場合に LCE の発現抑制の効果が高いことが確認できた。

【0098】

2. 培養細胞におけるLCE RNAiのLCE活性低下作用

LCEに対するRNAi (hLCE-siRNA-6)を導入したHepG2細胞を超音波破碎した後に、超遠心操作によりミクロソーム画分を調製した。次に、得られたミクロソーム画分のLCE活性を測定した。対照群には哺乳類遺伝子に相同性を持たない配列であるRNAi (scramble siRNA Duplex: Dharmacon, Inc.) を導入したHepG2細胞を用いた。

図5 (a), (b)に示すように、LCE特異的に発現が抑制されるとともに、LCEの活性が抑制されることが確認できた。

また、HepG2細胞にLCEに対する2種類のRNAi (発現抑制効果が強いもの：hLCE-siRNA-6、発現抑制効果が中程度のもの：LCE-siRNA-2)をそれぞれ導入したものを準備した。RNAiの導入後24時間及び48時間の時点で、細胞からtotal RNAを調製し、DNAチップ (Affimetrix社製) を用いて遺伝子発現解析を行ない、LCEに対するRNAiにより発現が低下している遺伝子を選択した。

RNAiの導入によりLCEの発現が抑制されていることを確認した結果を図6 (a), (b)に示す。RNAiの導入により発現が低下した遺伝子は、24時間で5遺伝子、48時間で64遺伝子であった。

これら発現が低下した遺伝子の中で、LCEと同じ脂肪酸合成に関与するFAS及びSCDに注目し、その発現量を検討した。

具体的には、LCE RNAi (hLCE-siRNA-6)を導入したHepG2細胞からtotal RNAを精製し、逆転写反応によりcDNAを得た。次に、ABI PRISM 7700 Sequence Detector Systemを用いたTaqManPCR法により、ヒトFAS mRNA及びヒトSCD mRNAの発現を測定した。標準曲線は、PCRにより調製したヒトFAS cDNA断片及びヒトSCD cDNA断片をそれぞれ用いて作成した。FAS及びSCDの発現量は β -アクチンの発現量でノーマライズした。

測定に用いたプライマー及びプローブの塩基配列を示す。

ヒトFAS用TaqMan probe

hFAS-P : 5' - ACC CGC TCG GCA TGG CTA TCT T -3' (配列番号39)

ヒトFAS用TaqMan primer

hFAS-F: 5'- GCA AAT TCG ACC TTT CTC AGA AC -3' (配列番号 40)

hFAS-R: 5'- GGA CCC CGT GGA ATG TCA -3' (配列番号 41)

ヒトFAS cDNA作成用PCR primer

hFAS-4823S: 5'- TAC GCC TCC CTC AAC TTC CG -3' (配列番号 42)

hFAS-5604A: 5'- CAC TTG AGG GGC CGT ACC AC -3' (配列番号 43)

ヒトSCD用TaqMan probe

hSCD-P: 5'- CAC ATG CTG ATC CTC ATA ATT CCC GAC G -3' (配列番号 44)

ヒトSCD用TaqMan primer

hSCD-F: 5'- GCC CAC CAC AAG TTT TCA GAA -3' (配列番号 45)

hSCD-R: 5'- CCA CGT GAG AGA AGA AAA AGC C -3' (配列番号 46)

ヒトSCD cDNA作成用PCR primer

hSCD-600S: 5'- TGT GGA GCC ACC GCT CTT AC -3' (配列番号 47)

hSCD-931A: 5'- AAG CGT GGG CAG GAT GAA GC -3' (配列番号 48)。

図7(a)~(c)に示すとおり、LCE RNAiの導入により、LCEの発現は顕著に低下する一方、FAS及びSCDはLCEほどの発現の低下は見られないものの、40~60%程度の発現低下が見られることが確認された。

実施例 9

実施例8と同様の実験をマウスLCEについても行った。用いたRNAiを以下に示す。

hLCE-siRNA-6(先述したヒトLCEに対するRNAiであるhLCE-siRNA-6と同じもの) (図8(a)中、6のRNAiの配列)

5'-AGGCCUGAAGCAGUCAGUUUU-3' (配列番号 49)

3'-UUUCCGGACUUCGUCAGUCAA-5' (配列番号 50)

mLCE-siRNA-7 (図8(a)中、m7のRNAiの配列)

5'-UCCCAUAUGGUGCAGCUAAUU-3' (配列番号 51)

3'-UUAGGGUAUACCACGUCGAUU-5' (配列番号 52)

mLCE-siRNA-11 (図8(a)中、m11のRNAiの配列)

5'-GCAUCCGUUGUUCAGUUGCUU-3' (配列番号 53)

3'-UUCGUAGGCAACAAGUCAACG-5' (配列番号 54)。

【0099】

図8(b)～(c)に示すように、各RNAiによりLCEの発現が抑制されることが確認された。

実施例 10

(培養細胞におけるLCE RNAiのFAS mRNAの発現に与える影響)

脂肪細胞に分化した3T3-L1細胞に上記のマウスLCEに対するRNAiを導入し、24時間後に細胞からtotal RNAを精製した。得られたtotal RNAより逆転写反応によりcDNAを調製し、ABI PRISM 7700 Sequence Detector Systemを用いたTaqManPCR法によりマウスFAS mRNAの発現量を測定した。標準曲線は、PCRにより調製したマウスFAS cDNA断片を用いて作成した。FASの発現量は β -アクチンの発現量でノーマライズした。

測定に用いたプライマーおよびプローブは下記の通りである。

マウスFAS用TaqMan probe

mFAS-P2: 5'- ATG CTG GCC AAA CTA ACT ACG GCT TCG -3' (配列番号 55)

マウスFAS用TaqMan primer

mFAS-F2: 5'- TGG CCT TCT CCT CTG TAA GCT G -3' (配列番号 56)

mFAS-R2: 5'- CTG TTC ACA TAT ACG CTC CAT GG -3' (配列番号 57)

マウスFAS cDNA作成用PCR primer

mFAS-5541S: 5'- TTC CGC TAC ATG GCT CAG GG -3' (配列番号 58)

mFAS-7551A: 5'- CCC GTA CAC TCA CTC GTG GC -3' (配列番号 59)。

【0100】

また、脂肪細胞に分化した3T3-L1細胞に、LCEに対するRNAi (hLCE-siRNA-6)を導入し、24時間後に培地に ^{14}C 標識酢酸ナトリウムを添加した。添加してから4時間後に細胞を0.1%SDSにて溶解し、15%水酸化カリウム-メタノール溶液を加え75℃45分間加熱によるけん化処理を行った。これに5N塩酸を加えた後、クロロホルム-メタノール(2:1)にて脂質成分を抽出した。抽出した脂質成分をsilica gel Gを用いた薄層クロマトグラフにより分画(ヘキサン:ジエチルエーテル:酢酸=80:20:1)し、脂肪酸画分に取り込まれた ^{14}C 酢酸を測定することで脂肪酸合成能を測定した。対照群には哺乳類遺伝子に相同性がない配列のRNAi (scramble siR

NA Duplex: Dharmacon, Inc.) を導入した3T3-L1細胞を用いた。

【0101】

図9(a)~(c)に示すように、LCEの発現を抑制することにより、脂肪酸の合成が抑制されることが確認できた。

【0102】

実施例11

(培養細胞におけるLCE RNAiのアポリポタンパク質Bの分泌に与える影響)
HepG2細胞にLCEに対するRNAi (hLCE-siRNA-6)を導入し48時間後に培地を交換した。培地交換後48時間インキュベートし、培養上清を回収し、培地中に分泌されたアポリポタンパク質Bを定量した。アポリポタンパク質Bの測定には、マイクロプレートのEIA法(Exocell, Inc社製: APO B TEST)を用いた。アポリポタンパク質B標準液を用いて標準曲線を作成し、培養上清中のアポリポタンパク質Bの濃度を求めた。対照群には哺乳類遺伝子に相同性がない配列のRNAi (scramble siRNA Duplex: Dharmacon, Inc. 社製) を導入したHepG2細胞を用いた。

【0103】

図10(a), (b)に示すように、LCEの発現を抑制することによりアポリポタンパク質Bの分泌が抑制されることが確認できた。

【0104】

以上より、LCEの活性を抑制することにより、抗肥満効果を示すことが示唆された。

【0105】

実施例12

(LCE RNAi投与によるマウスへの影響)

7週齢のマウス(ICR、雌)を高カロリー食であるMHFdietを与えて23週間飼育し、肥満を形成させた。まず、RNAiの投与開始前にマウスの体重を測定した。RNAi (hLCE-siRNAi-6)を、HVJ-リポソームをキャリアとして用いてマウスの尾静脈から投与した(40 μ g RNAi/mouse/injection)。投与は1日おきに5回行い、最終投与から2日後にマウスの体重を測定し、RNAi投与の前後での体重変化を求めた。また、眼窩上脈叢より採血し血糖値を測定した。さらに、腹部大静脈より採血し血

漿インスリン濃度を測定した。対照群には、哺乳類細胞では効果を示さないscramble RNAiを投与したマウスを用いた。

図11(a)～(c)に示すように、マウスにLCEのRNAiを投与することにより、体重が減少した。また、血糖値および血漿インシュリンレベルのいずれもが減少し、LCEに対するRNAiが個体レベルでもLCEの活性を抑制し、肥満改善効果を示すことが確認できた。

【0106】

【発明の効果】

以上説明したように、本発明の化合物の評価方法等によれば、LCEと肥満との直接的な関係が明らかとなり、分子レベルで判断可能な肥満又は痩せ検査方法及び当該分子を用いた肥満及び痩せの検査薬等を提供することが可能となる。また、肥満又は痩せの治療薬や診断薬のスクリーニングする等、化合物の評価方法を提供することが可能となる。さらに、脂肪合成の抑制や肥満の抑制をする方法を提供することが可能となる。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> BANYU PHARMCEUTICAL CO., LTD

<120> Evaluation method of the chemical compound which is effective to the obesity treatment with LCE

<130> 0322

<160> 59

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 3045

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

actaagaccg caaggcattc atttcctcct acggtggatg cggacgccgg gaggaggaga 60

gccccagaga gaggagctgg gagcggaggc gcaggcaatg ctcagccctg gatgtagctg 120

agaggctggg agaagagacg accgctggag accgagcggc gtggggaaga cctagggggg 180

tgggtggggg aagcagacag gagaacactc gaaatcaagc gctttacaga ttattttatt 240

ttgtatagag aacacgtagc gactccgaag atcagcccca atgaacatgt cagtgttgac 300

tttacaagaa tatgaattcg aaaagcagtt caacgagaat gaagccatcc aatggatgca 360

ggaaaactgg aagaaatctt tcctgttttc tgctctgtat gctgccttta tattcgggtg 420

tcggcaccta atgaataaac gagcaaagtt tgaactgagg aagccattag tgctctggtc 480

tctgaccctt gcagtcttca gtatattcgg tgctcttcga actggtgctt atatggtgta 540

cattttgatg accaaaggcc tgaagcagtc agtttgtgac cagggttttt acaatggacc 600

tgtcagcaaa ttctgggctt atgcatttgt gctaagcaaa gcacccgaac taggagatac 660

aatattcatt attctgagga agcagaagct gatcttcctg cactggtatc accacatcac 720

tgtgctcctg tactcttggg actcctacaa agacatgggt gccgggggag gttggttcat 780
gactatgaac tatggcgtgc acgccgtgat gtactcttac tatgccttgc gggcggcagg 840
tttccgagtc tcccggaagt ttgccatggt catcaccttg tcccagatca ctgagatgct 900
gatgggctgt gtggttaact acctggtctt ctgctggatg cagcatgacc agtgtcactc 960
tcactttcag aacatcttct ggtcctcact catgtacctc agctaccttg tgctcttctg 1020
ccattttctt tttgaggcct acatcggaac aatgaggaaa acaacgaaag ctgaatagtg 1080
ttggaactga ggaggaagcc atagctcagg gtcacataga aaaataatag acaaaagaaa 1140
atggcacaag gaatcacacg tgggtgcagct aaaacaaaac aaaacatgag caaacacaaa 1200
accaaggca gcttagggat aattaggttg atttaaccca gtaagtttat gatcctttta 1260
gggtgaggac tcaactgagt cacctccatc tccaagcact gctgctggaa gacccattc 1320
cctctttatc tatcaactct aggacaaggg agaacaaaag caagccagaa gcagaggaga 1380
ctaataaag gcaacaaaag gctattaaca cataggaaaa tatgtattta ctaagtgtca 1440
catttctcta agatgaaaga tttttactct agaaactgtg cgagcacaac acacacaatc 1500
ctttctaact ttatggacac taaactggag ccaatagaaa agacaaaaat gaaagagaca 1560

cagggtgtat atctagaacg ataatgcitt tgcagaaact aaagccittt taagaaatgc 1620
cagctgctgt agaccccatg agaaaagatg tcttaatcat ccttatgaaa acagatgtaa 1680
acaactatat ttcaactaac ttcatttca ctgcatagcc tcaggctagt gagtttgcca 1740
aaaccaaagg ggggtgaatac ttccccaaga ttcttcctgg gaggatggaa acagtgcagc 1800
ccagggtcca tgggggcagc tccatcccag agcatttctg atagttgaac tgtaatttct 1860
actcttaagt gagatatgaa gtattatcct tttgttcagt tgccccgggc ttttgaacag 1920
aagagtaa at acagaattga aaaagataaa cactcaacca aacaatgtga aaacgggttc 1980
tgtagtattt gtaaaaaggc ccggcccagg accactgtga gctggaaaag ggagaaaaggc 2040
agtgggaaaa gaggtgagcc gaagatcaat tcgacagaca gacggtgtgt atgcccctcc 2100
ctgtttgact tcacacacac tcataacttt ccaa atgaaa cccacagta tagcgcatat 2160
tttcgatatt tttgtgaatt ccaaaaggaa atcacagggc tgttcgaaat attgggggaa 2220
cactgtgttt ctgcatcatc tgcatttgct cccaagcaa tgtagagggtg tttaaagggc 2280
cctctgctgg ctgagtggca atactacaac aaacttcaag gcaagtttgg ctgaaaacag 2340
ttgacaacaa agggccccca tacacttacc cctcaaattt taagtgatat gaaatacttg 2400
tcatgtcttt ggccaaatca gaagatatcc atcctgcttc aagtcagctt cagaaatgtt 2460

ttaaaaggga ctttagctct ggaactcaaa atcaatttat taagagccat attcttttaa 2520
aaaaaaagct ggataatatt atctgtaata tttcagtcct ttacaagcca aatacatgtg 2580
tcaatgtttc tagtatttca aagaagcaat tatgtaaagt tgttcaatgt gacataatag 2640
tattataatt ggttaagtag cttaatgatt aggcaaacta gatgaaaaga ttaggggctt 2700
ccacactgca tagatcacac gcacatagcc acgcatacac acacagacac acagatgtgg 2760
ggtacactga atttcaaagc ccaaataaat agaaacacat tttctggcta gcagaaaaaa 2820
acaaaacaaa actgttgttt ctctttcttg ctttgagagt gtacagtaaa agggattttt 2880
tcgaattatt tttatattat tttagcttta attgtgctgt cgttcatgaa acagagctgc 2940
tctgcttttc tgtcagagat ggcaagggt ttttcagcat ctcgtttatg tgtggaattt 3000
aaaaagaata aagttttatt ccattctgaa aaaaaaaaaa aaaaa 3045

<210> 2

<211> 5893

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 2

tggatgcgga cgctgggagg agagcccctg agctaggagc tgggagcaga ggcgagaga 60

acacgtagcg actccgaaga tcagcccaaa tgaacatgtc agtgttgact ttacaagaat 120
atgaattcga aaagcagttc aacgagaacg aagccatcca atggatgcag gaaaactgga 180
agaagtcttt cctgttttct gcgctgtacg ctgcctttat ctttggtggt cggcatctga 240
tgaacaagcg agccaagttt gaacttcgga agccgctcgt gctctggtcg ctgactcttg 300
ccgtcttcag tatattcggg gctcttcgaa ctgggtgccta catgctgtac attctgatga 360
ccaaaggcct gaagcagtca gtttgtgacc agagttttta caatggacct gtcagcaaatt 420
tctgggccta tgcattttgtg ctcagcaaag caccgaact aggtgacacg atattcatca 480
ttctgaggaa acagaaactg atcttcctgc actggtacca ccacatcact gtgctcctgt 540
actcctggta ctctacaaa gacatggtcg ctgggggtgg ttggttcatt actatgaact 600
atggcgtgca tgccgtcatg tactcttact acgccttgcg ggctgcgggt ttccgagtct 660
cccggaagtt tgccatgttc atcaccttgt ccagatcac tcagatgctg atgggctgtg 720
tcattaacta cctgggtcttc aactggatgc agcatgacaa cgaccagtgc tactcccact 780
ttcagaacat cttctggtcc tcgctcatgt acctcagcta ccttgtgctc ttctgccatt 840
tcttctttga ggcctacatc ggcaaagtga agaaagccac gaaggctgag tagtgtcagg 900

gctgaggagg aagtcatagc tcagggtcat cacgaaaaat aatcgacaaa agaaaaatgg 960
cacaaggaat cccatatggt gcagctaaaa caaaacaaaa catccgtatg agcaggcacg 1020
aggcccaagg cagcttggga ctgaagatta ggttgtaagt ttatgacctt ttctgggtga 1080
ggactcgctg agtgcaactc ttatctcaaa gcacggctgc tgaggggacc ccttcctctt 1140
ggcctgtcaa ctctagaaca cactagatgc aaaggcagcc acgggcaaag agattgggca 1200
gagattagtg gacggccagc aaaacactgc aggaagcagg tggggggagg aatctactca 1260
gccittttgt ttgttttgt ttgttttgt ttgtttttc tctaaggata aaggagtttc 1320
cccttttcaa acgatgtgag cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca 1380
cacacgaat cttttcaaca cgaaaccaga gctaaaagaa aagataaaca tgggagagac 1440
agggtttcta tctgggacag caatgctttt gcaaaaggct aggcctttta aagaaagggtg 1500
agcttgtaac tccttgataa aagatgtctt aattattttt actgcaactg aaagtaaaga 1560
ggtagagcct ttccccttct gcacagcctc agggcttgta tgttcgctac aaccaaacac 1620
aggacagtac ttccccatg atactttatt actgggagaa agaaaccctt gtagttgaaa 1680
caccacactg acaactgtta tttctgctct ccgacgagaa ttcaagcatc cgttgttcag 1740
ttgccccaaa ctttagtgac ggaggagtaa atgcagaact gaaagggaag aagctcagct 1800

ggctggcttg aaaatggagt cttgtacat gtgtaacaaa tgccagccca tcgtccctgg 1860
agctgaacag ggaggaaggg ctatgggcag agactagagc cggattcatc caatgtgcag 1920
acagcgtgtt cgcctccctc cctgttcgac ctacacata atcctggctt tctaaatgag 1980
gccctgtgac acactctgtg ctttctatat tttgtgact ttcaaacaca gatctgcagg 2040
gctctgcctg atttggggta aacactgtgt ttctgcagcc tctgcatttg ctcccttcag 2100
cagtgcagag gcttgagaag tgccctctgc tggcttagtg agaagcttca acaaacactt 2160
cacagtagtg ttgaaataac tgaccactaa gggcctgcgg agattaaacc ctaagttcta 2220
agtgcgtgca aacacctgac atatatttga ccaaatcaga aatttttttag gtgactttca 2280
cttgagaact cagaaagtca atgtattaag agccatattc tgaaagaaag aaagagaaag 2340
agagaaagaa agaaagaaag aaagaaagaa agaaagaaag aaagaaagaa agaagaaaga 2400
aagaaagaaa gaaagcaagc tagacaatgt taactgtaat atttcagtcc tctacaagcc 2460
aaataaatgt gtcgatgttc ctaatatattc aaagacgcaa ttacataaag ttgttcaatg 2520
tgatataata gtattctaatt tggtaagta gtttaatgat taggcaaact agcagaaaca 2580
attagaggct gctacaccac gtagattata cacacatagc cacgtacgtg aggtacacgg 2640

agctataaag ctcaaataca tagtaacacg atttttggct agcagaaact atcacctatc 2700
ttcctttact tgagagtgtc cagtaaaagg gatttttttc aaattatatt tatattattt 2760
tagctttaat tgtgctgtca ttcattggaac agctgctcag cagccttcct gtgagagatg 2820
acaggggtgt tttcgtgtgg cttgtttacg tgtggaattg gaaaagaata aaatctgatt 2880
cccttctgtg ggaatgggat caagggtaga caaaggaccc atgtagatca agtcataact 2940
gaacgaccag ggaaggggagc caggcggggg cgggagtcag ctgtggcttt catgttacca 3000
ttgtgtggtg gctgatggac gggacgtggt tggagggatg ttttcttact tggggtagaa 3060
gctaaccgga gatgaaagtc tagaagccac tctgtccagt ggaatcttag ggtgtacttg 3120
ttcctttgag ctttgtaaata gcacaatagt gtacaataat aagcctttcc cttgccttat 3180
ggaagaaagt gagcaagata atgaaaacca agaagccacc tatcagttga attgagtcta 3240
atcaaaaggc cagcctgagg ctcctctggt cggttcagtt taatttagat atttaccata 3300
gaatacaggt acaatatgga aatctcataa gcataaactt taaaacgact aagctatgct 3360
tccaaagcac tttagtctca gtgttcttcg cttcatgctc tctccacttg taaaataact 3420
tagacttttc attcgcagga tgagtatata ataattaagt ttccaaacca gctaaactgt 3480
agctacaggc aattccagtg ttcacatgg gaagaaaaag ccacatgttt ttttaaaaac 3540

acagaattct gatataggct cagcacacag tttttaacat atcagcttag ctgctctaata 3600
tgtatcaaga tacgaggctg gaccactggc ctatgacaca tctaaaacct gccagaattg 3660
actgccacgt agataatact gctgtcagtg aacattccgg gcaagcaagt tttgttagct 3720
gccccactat gctgcaatag attatctttc tattgaagat ttctcgctgc attccaatcc 3780
cagtgtgggtg aaaacttaat tcctggattg aatgaacaca aatccgaggt ttcataataa 3840
cgcagtgcgg tcactaggctc tgagcatcaa ctcaaatgtg ttgagtttgc aatgaaattc 3900
tagtgagaat cactccattc acacagtagg agatttttat ctggaccttc tagtgtcaac 3960
tgtgaggaga aacaactatc attattatth atttattgta tttatatcca atgccaggcc 4020
aaagtattga tttagatcaa gcagtgccct tccccccct cccaaccccc catctttcta 4080
atccttctgc actatagaaa gtcaagactg gaggggaaat ccatattcat tgctgcaggg 4140
gaaagcaggt ttattaatcc tcccgtgtc tttatgagac cgattgacca atgtagctca 4200
ggcagaagtt tcatgtgggt gggatatcta caggagccta ggaaaacact tccagagaag 4260
ataaccacag actgttgttt ttgttcattt gttttatata ttcattggtta gataagcctg 4320
tcacggagtt acaaggcacc atgacactaa ggtagaatgt tccagaagtc tggctacctt 4380

cccaggctgc tcagttacct gggagtgtct agttactatc ttgttctgac gagaggagct 4440
tttgctcaag aactgccaga tacagacacc aagtcagccc tggcacactc tacaacctcc 4500
gggcataggt aatgggtctt tgactattgg attgcctcag tgtcaagtga gttcctagaa 4560
gaagagaccg agtaggctct acccccaga ctccaccaca ctctgagttg cattgacagg 4620
atcgggtgtct agacacagtt ctttgtgaag tgtcaatgct agagacagtt gtgaggagat 4680
catgatgaca gcccagaact ttctagcttt caaatgcac cttttccagt ctttgttttg 4740
ataacagcta ttttgctatc agtttgggac aacagtagag tctgtggcca tgtgatctac 4800
agcttatgat cacacagctc ccatttcctg gtgcctgaga tcccagccat cagaaagtga 4860
tttgggtgag aattcacaac atatatgtca cctctgcata ttgaagtga atctaataaa 4920
acaaggacgt cctattttgt ctgaaccgc tgaatgaagc tctgttatcc tagttagtca 4980
ttgggccgcc atcctctgta cccgatagt acacaaaaca gatgtcgggtg cctgtacaag 5040
aattctcagt gcctgtttgt acagactgtg cttagaagaa acattcgtga gccataaagc 5100
aggaaccaca gatgaaaggg ccagttaaaa gtccacctgc tccaagtatc atagaaaacc 5160
caaaagcctg ttgtataatc tggattgtc cccatcccca gatgcittga aaactaggat 5220
tctcagagca tggataccca cgcttccatc ttcccacaaa catttcctag agttgtactg 5280

gtgggtgcag ccctaggtgg ttggttgggg gaagtcttgg aagctgtact ttgattgcag 5340
gtcaagcaaa gccaaatcca gatatttctg tgtcactcac cagttgtcca tgtccaccca 5400
caaaacaatt gtattatagt caagttgtcc tagctgattg gtcctcaa at aaggatgcaa 5460
ctatgtttgc aaccagtta ggacacattt gaaagaacct gactcactag catctaaaca 5520
atatcatttc cccaatgctt ggtggcactt cagacttttg ttctcctggg tgatcaagg 5580
gttgccctggg ggtgccgcct cctagtgtga atatttcagt taagtgtggg tctgagcatg 5640
accgggctgg gcttagctca ctgctacttg gaaaatgact ggcattctgc ttcctaggcc 5700
ctaaacccat attcagaggg aaaattcact atcaagcctc acagcgaaat cacagcagtg 5760
ttggaattct tatittcaag tgcttatctc acaacattga aaaatatttt tgggtgtatta 5820
agatttaaaa taaagtcatc ataaactttt gaatttaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 5880
aaaaaaaaaa aaa 5893

<210> 3

<211> 34

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 3

gccaccatgg gcaacatgtc agtgttgact ttac

34

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 4

ctactcagcc ttcgtggctt tctt

24

<210> 5

<211> 27

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> probe

<400> 5

ctttcctgtt ttctgcgctg tacgctg

27

<210> 6
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> PCR primer

<400> 6
 ggatgcagga aaactggaag aa

22

<210> 7
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> PCR primer

<400> 7
 tgccgaccac caaagataaa g

21

<210> 8
 <211> 19
 <212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> probe

<400> 8

atcactgtgc tcctgtact

19

<210> 9

<211> 23

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 9

agctgatctt cctgcactgg tat

23

<210> 10

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 10

ggcaaccatg tctttgtagg agta

24

<210> 11

<211> 34

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 11

gccaccatgg gcaacatgtc agtggtgact ttac

34

<210> 12

<211> 25

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 12

ctattcagct ttcgttgttt tcctc

25

<210> 13

<211> 21

<212> RNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> sense strand of RNAi

<400> 13

gaccgcaagg cauucuuuu u

21

<210> 14

<211> 21

<212> RNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> antisense strand of RNAi

<400> 14

uucuggcguu ccguaaguaa a

21

<210> 15

<211> 21

<212> RNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> sense strand of RNAi

<400> 15

cacucgaaau caagcgcuuu u

21

<210> 16

<211> 21

<212> RNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> antisense strand of RNAi

<400> 16

uugugagcuu uaguucgcga a

21

<210> 17

<211> 21

<212> RNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> sense strand of RNAi

<400> 17

cacguagcga cuccgaagau u

21

<210> 18

<211> 21

<212> RNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> antisense strand of RNAi

<400> 18

uugugcaucg cugaggcuuc u

21

<210> 19

<211> 21

<212> RNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> sense strand of RNAi

<400> 19

ugaagccauc caauggaugu u

21

<210> 20

<211> 21

<212> RNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> antisense strand of RNAi

<400> 20

uuacuucggu agguuaccua c

21

<210> 21

<211> 21

<212> RNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> sense strand of RNAi

<400> 21

gccauuagug cucuggucuu u

21

<210> 22

<211> 21

<212> RNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> antisense strand of RNAi

<400> 22

uucgguaauc acgagaccag a

21

<210> 23

<211> 21

<212> RNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> sense strand of RNAi

<400> 23

aggccugaag cagucaguuu u

21

<210> 24

<211> 21

<212> RNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> antisense strand of RNAi

<400> 24

uuuccggacu ucgucaguca a

21

<210> 25

<211> 21

<212> RNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> sense strand of RNAi

<400> 25

uggaccuguc agcaaauucu u

21

<210> 26

<211> 21

<212> RNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> antisense strand of RNAi

<400> 26

uuaccuggac agucguuuuaa g

21

<210> 27

<211> 21

<212> RNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> sense strand of RNAi

<400> 27

agcaccgaa cuaggagauu u

21

<210> 28

<211> 21

<212> RNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> antisense strand of RNAi

<400> 28

uuucgugggc uugauccucu a

21

<210> 29

<211> 21

<212> RNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> sense strand of RNAi

<400> 29

caucuucugg uccucacucu u

21

<210> 30

<211> 21

<212> RNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> antisense strand of RNAi

<400> 30

uuguagaaga ccaggaguga g

21

<210> 31

<211> 21

<212> RNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> sense strand of RNAi

<400> 31

ucacacgugg ugcagcuaau u

21

<210> 32

<211> 21

<212> RNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> antisense strand of RNAi

<400> 32

uuagugugca ccacgucgau u

21

<210> 33

<211> 21

<212> RNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> sense strand of RNAi

<400> 33

gcacugcugc uggaagaccu u

21

<210> 34

<211> 21

<212> RNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> antisense strand of RNAi

<400> 34

uucgugacga cgaccuucug g

21

<210> 35

<211> 21

<212> RNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> sense strand of RNAi

<400> 35

acugugcgag cacaacacau u

21

<210> 36

<211> 21

<212> RNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> antisense strand of RNAi

<400> 36

uuugacacgc ucguguugug u

21

<210> 37

<211> 21

<212> RNA

<220>

<400> 37

21

<211> 21

<213> artificial sequence

$\langle 220 \rangle$

<400> 38

21

<211> 22

<213> artificial sequence

<220>

出証特 2004-3080943

<400> 39

acccgctcgg catggctatc tt

22

<210> 40

<211> 23

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 40

gcaaattcga cttttctcag aac

23

<210> 41

<211> 18

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 41

ggaccccggtg gaatgtca

18

<210> 42

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 42

tacgcctccc tcaacttccg

20

<210> 43

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 43

cacttgaggg gccgtaccac

20

<210> 44

<211> 28

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> probe

<400> 44

cacatgctga tcctcataat tcccgcacg

28

<210> 45

<211> 21

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 45

gccaccaca agttttcaga a

21

<210> 46

<211> 22

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 46

ccacgtgaga gaagaaaaag cc

22

<210> 47

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 47

tgtggagcca ccgctcttac

20

<210> 48

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 48

aagcgtgggc aggatgaagc

20

<210> 49

<211> 21

<212> RNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> sense strand of RNAi

<400> 49

aggccugaag cagucaguuu u

21

<210> 50

<211> 21

<212> RNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> antisense strand of RNAi

<400> 50

uuuccggacu ucgucaguca a

21

<210> 51

<211> 21

<212> RNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> sense strand of RNAi

<400> 51

ucccauaugg ugcagcuaau u

21

<210> 52

<211> 21

<212> RNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> antisense strand of RNAi

<400> 52

uuaggguaau ccacgucgau u

21

<210> 53

<211> 21

<212> RNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> sense strand of RNAi

<400> 53

gcauccguug uucaguugcu u

21

<210> 54

<211> 21

<212> RNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> antisense strand of RNAi

<400> 54

uucguaggca acaagucaac g

21

<210> 55

<211> 27

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> probe

<400> 55

atgctggcca aactaactac ggcttcg

27

<210> 56

<211> 22

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 56

tggccttctc ctctgtaagc tg

22

<210> 57

<211> 23

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 57

ctgttcacat atacgctcca tgg

23

<210> 58

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 58

ttccgctaca tggctcaggg

20

<210> 59
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> PCR primer

<400> 59
cccgtacact cactcgtggc

20

【図面の簡単な説明】

【図 1】

(a)は、LCEを強制発現した細胞において、発現量が増加していることを確認したグラフである。

(b)は、LCEが強制発現された細胞におけるLCEの活性を確認したグラフである。

【図 2】

(a)～(c)は、内部標準物質としてトリグリセリドを使用した場合のLCEの発現量と脂肪酸組成との関係を示すグラフである。

(d)～(f)は、内部標準物質としてコレステロールエステルを使用した場合のLCEの発現量と脂肪酸組成との関係を示すグラフである。

(g)～(i)は、内部標準物質としてリン脂質を使用した場合のLCEの発現量と脂肪酸組成との関係を示すグラフである。

【図 3】

(a)は、内部標準物質としてトリグリセリドを使用した場合のLCEの発現量と脂肪酸組成との関係を示すグラフである。

(b)は、内部標準物質としてコレステロールエステルを使用した場合のLCEの発現量と脂肪酸組成との関係を示すグラフである。

(c)は、内部標準物質としてリン脂質を使用した場合のLCEの発現量と脂肪酸組

成との関係を示すグラフである。

【図 4】

(a)は、LCE遺伝子上でLCE RNAiを設定した箇所を示す図である。

(b)は、RNAiによるLCEの発現抑制を確認したグラフである。

【図 5】

(a)は、LCE RNAiによるLCEの発現抑制を確認したグラフである。

(b)は、LCE RNAiによるFatty acyl CoAの伸長活性を確認したグラフである。

【図 6】

(a)は、LCE RNAiを導入して24時間後のLCEの発現量を確認したグラフである。

(b)は、LCE RNAiを導入して48時間後のLCEの発現量を確認したグラフである。

【図 7】

(a)は、LCE RNAiを導入した場合のLCEの発現量を確認したグラフである。

(b)は、LCEの発現抑制とFASの発現量との関係を示すグラフである。

(c)は、LCEの発現抑制とSCDの発現量との関係を示すグラフである。

【図 8】

(a)は、マウスLCE遺伝子上でLCE RNAiを設定した箇所を示す図である。

(b)は、RNAiを導入した場合のマウスLCEの発現量を確認したグラフである。

(c)は、マウスLCEの発現抑制とマウスSCDの発現量を確認したグラフである。

【図 9】

(a)は、RNAiを導入した場合のLCEの発現量を確認したグラフである。

(b)は、LCEの発現抑制とSCDの発現量との関係を示すグラフである。

(c)は、LCEの発現抑制と脂肪酸合成量との関係を示すグラフである。

【図 10】

(a)は、RNAiを導入した場合のLCEの発現量を確認したグラフである。

(b)は、LCEの発現抑制とアポリポタンパク質の分泌量との関係を示すグラフである。

【図 11】

(a)は、LCEの発現抑制と体重変化との関係を示すグラフである。

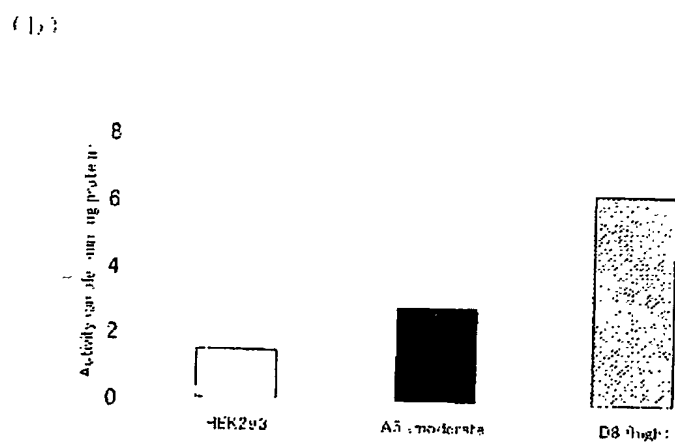
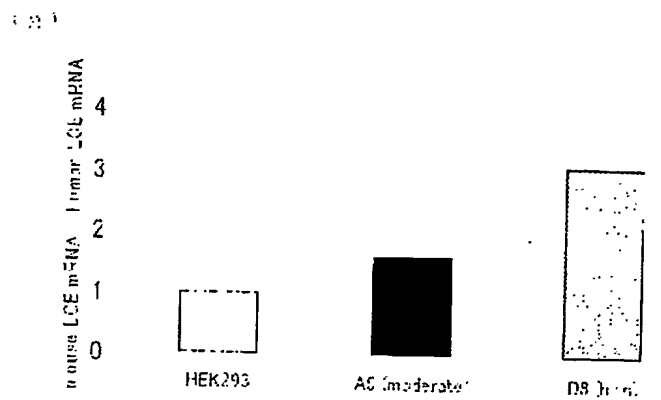
(b) は、LCE の発現抑制と血糖値との関係を示すグラフである。

(c) は、LCE の発現抑制と血漿インシュリンレベルとの関係を示すグラフである

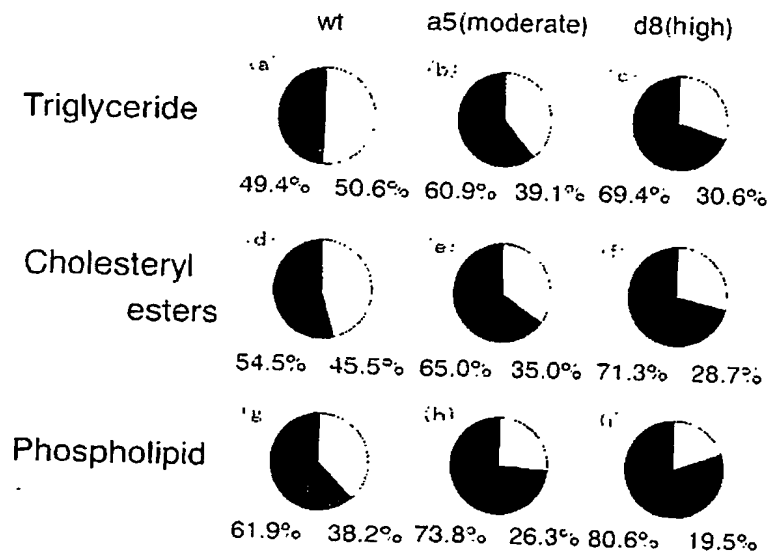
。

【書類名】 図面

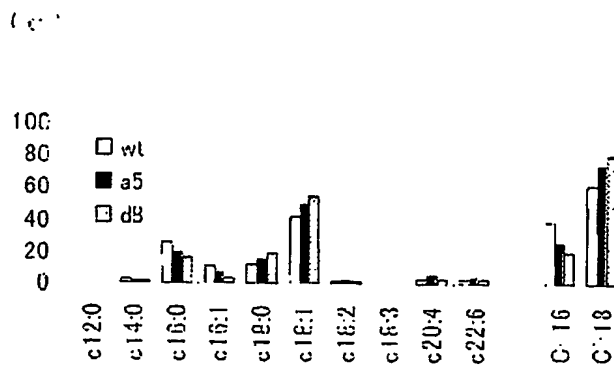
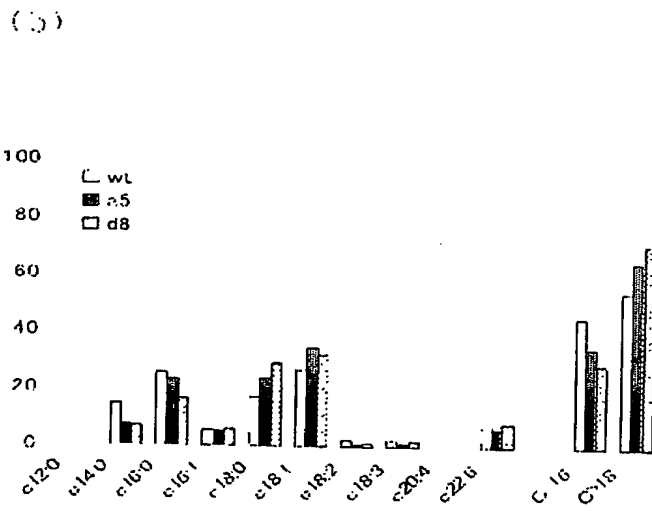
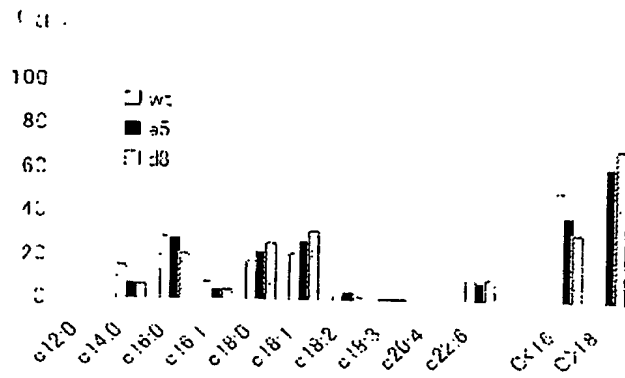
【図 1】



【図 2】

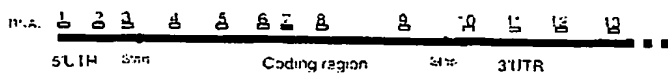


【図 3】

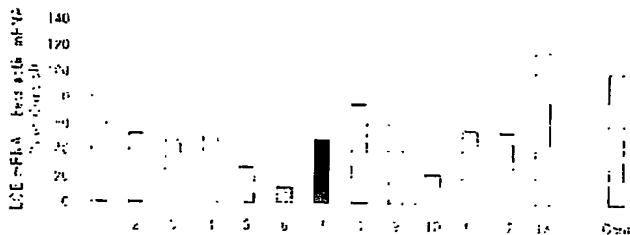


【図 4】

(a)

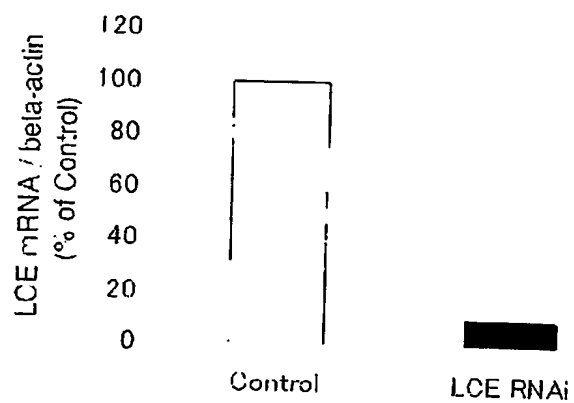


(b)

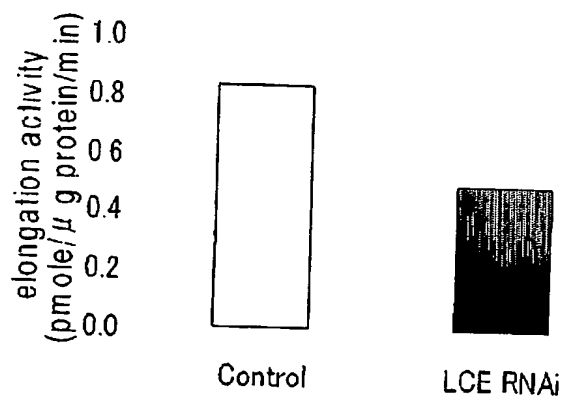


【図 5】

(a)

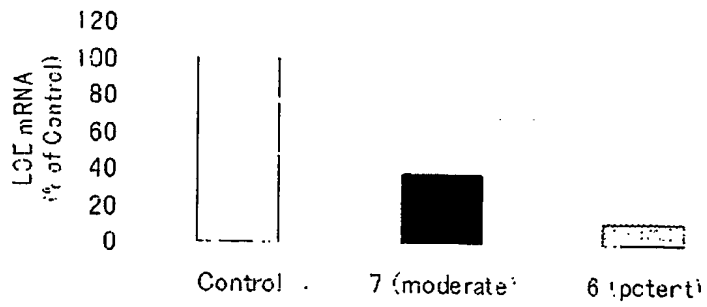


(b)

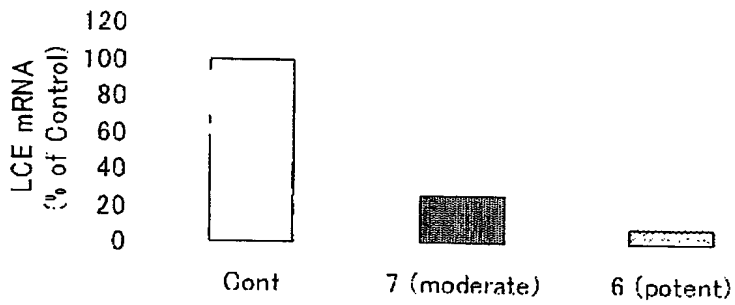


【図 6】

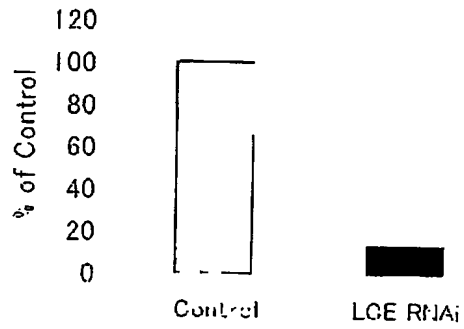
(a)



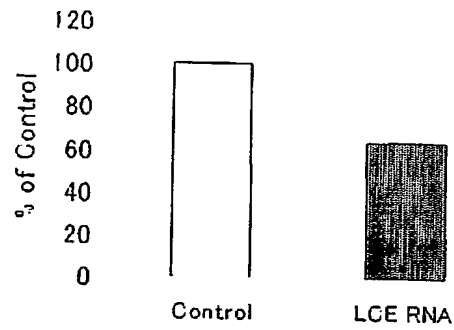
(b)



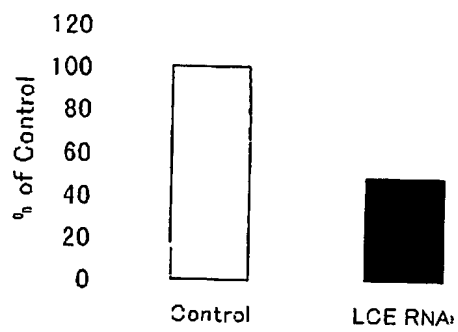
【図 7】



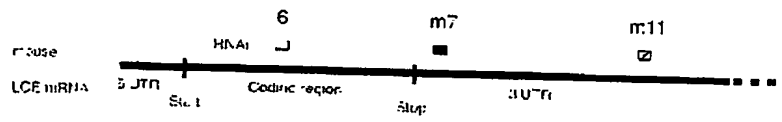
(b)



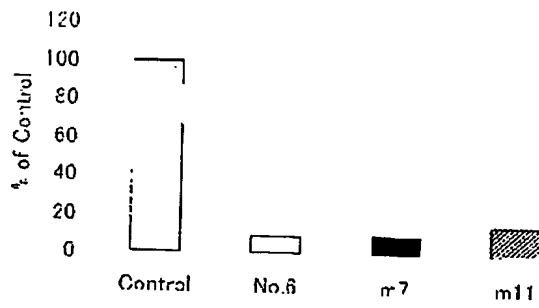
(c)



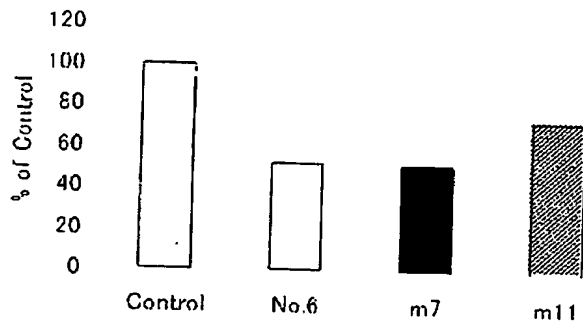
【図 8】



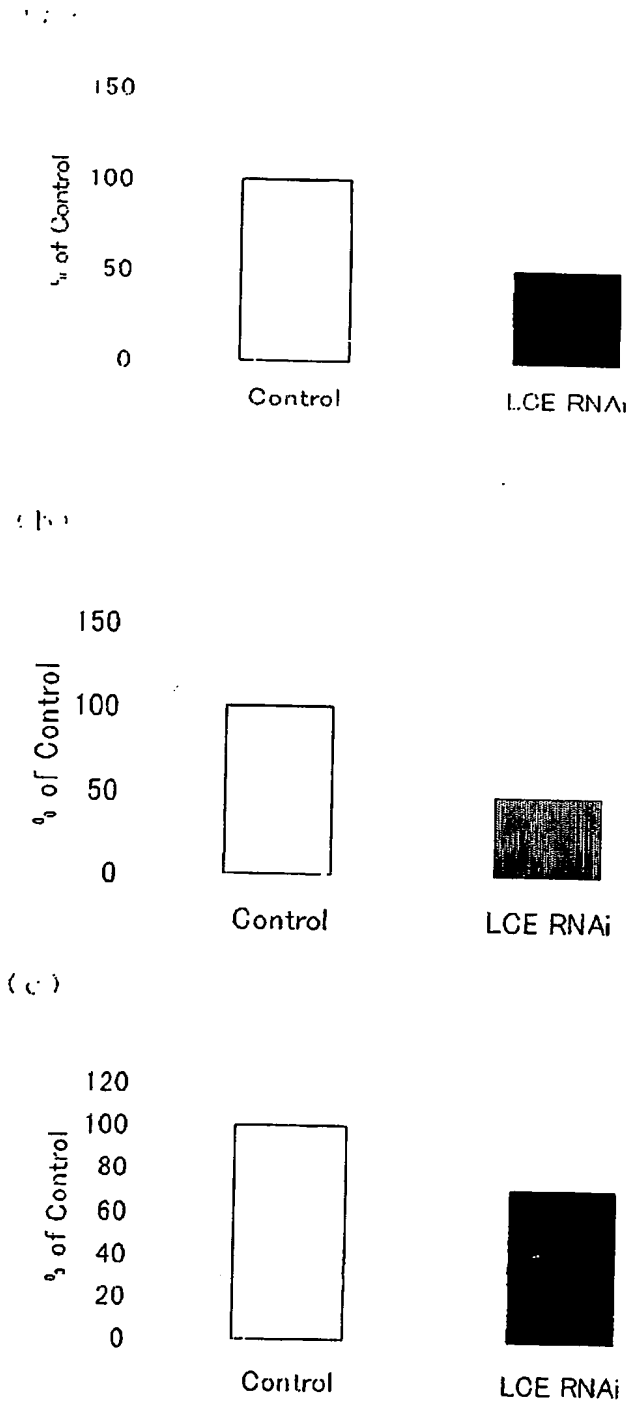
(a)



(b)

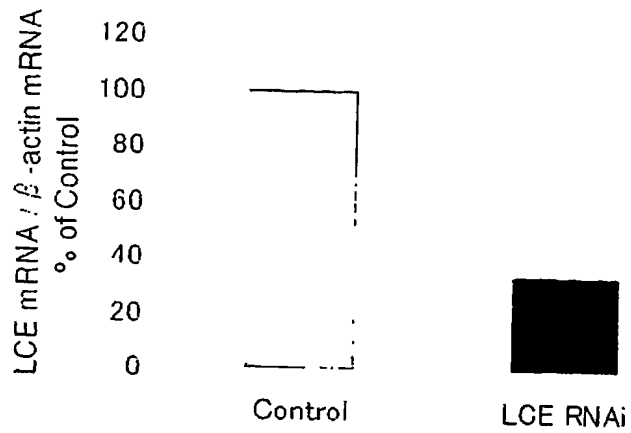


【図 9】

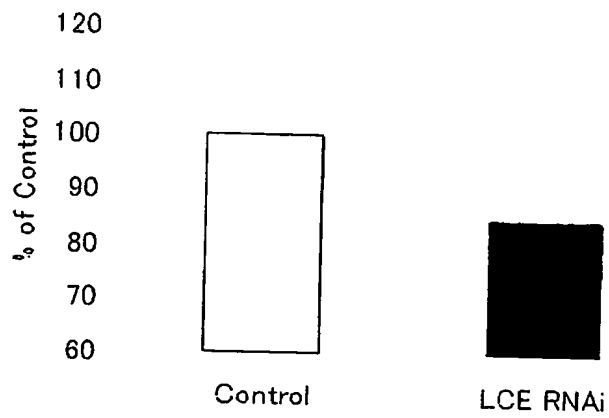


【図 10】

(a)

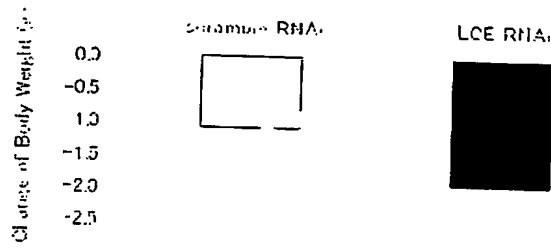


(b)

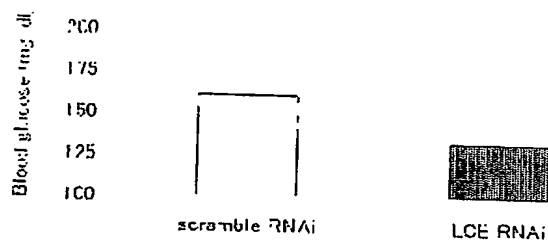


【図11】

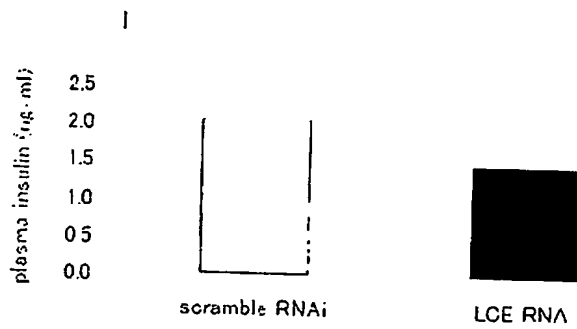
(c)



(d)



(e)



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 分子レベルで判断可能な肥満又は痩せの検査方法及び当該分子を用いた肥満及び痩せの検査薬を提供すること。また、肥満又は痩せの治療薬のスクリーニング等、化合物の評価方法を提供すること。

【解決手段】 肥満又は痩せの検査において、LCE遺伝子又はタンパク質の被検組織又は被検細胞における発現レベルや、当該遺伝子における多型等に基づいた検査をすること。また、肥満又は痩せの治療薬のスクリーニング等をはじめとする化合物の評価において、LCE遺伝子又はタンパク質の性質を利用して当該評価をすること。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2003-196154
受付番号	50301157028
書類名	特許願
担当官	第一担当上席 0090
作成日	平成15年 7月14日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成15年 7月11日

特願 2003-196154

ページ: 1/E

出願人履歴情報

識別番号

[000005072]

1. 変更年月日

1990年 8月 7日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都中央区日本橋本町2丁目2番3号

氏 名

萬有製薬株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.